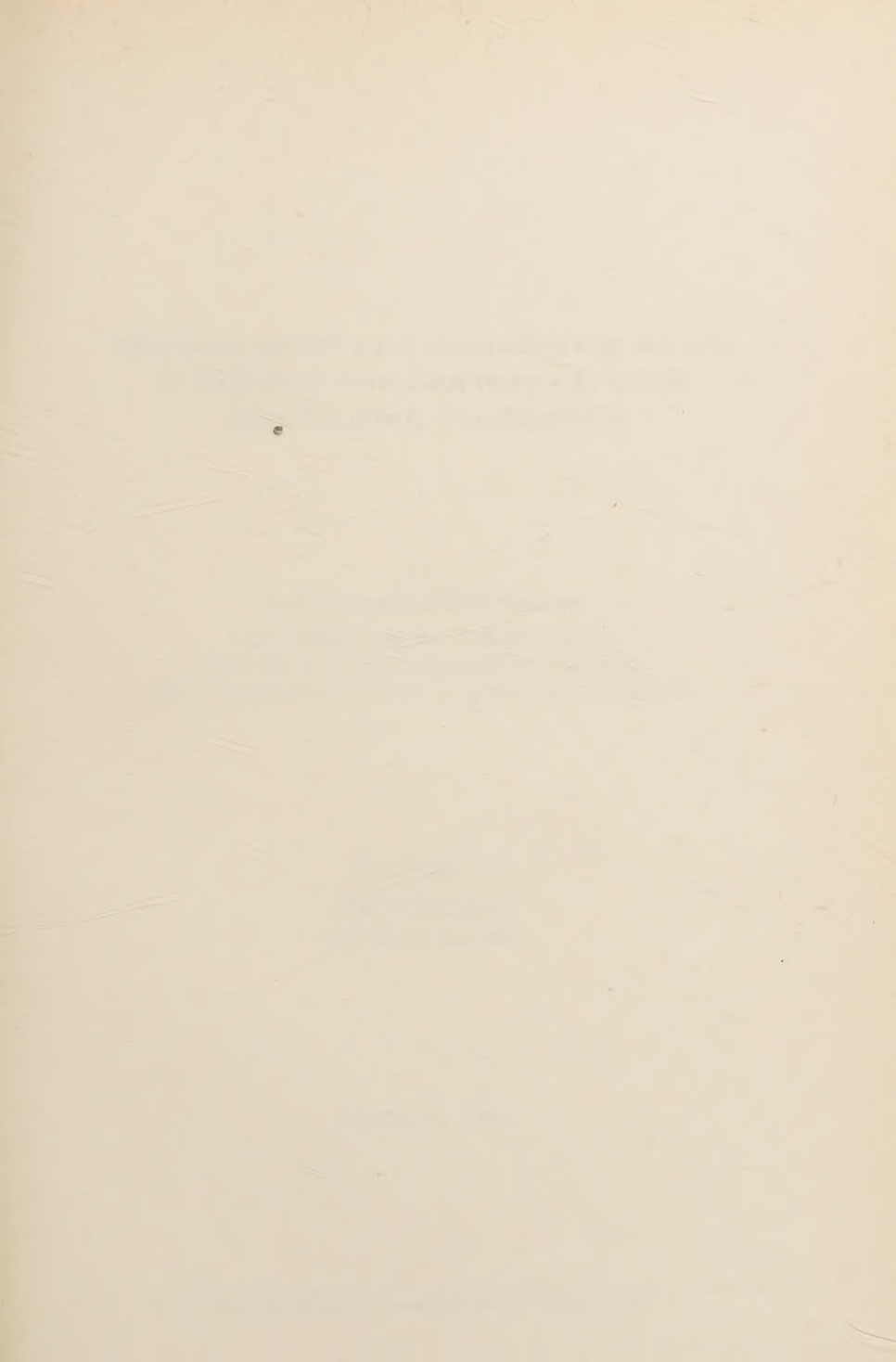


**Stofftransport und korrelatives Altern
in Blättern von Zea mays L. unter
dem Einfluß von Kinetin**

Karl Müller

1964
=





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548301_0055

**Stofftransport und korrelatives Altern
in Blättern von Zea mays L. unter
dem Einfluß von Kinetin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Karl Müller
aus Schauenstein

München 1964

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. BRAUNER
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. MERXMÜLLER

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 7. 1964



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. EINLEITUNG	5
II. MATERIAL UND METHODEN	6
1. Pflanzenmaterial	6
2. Radioisotope	7
3. Messung der Radioaktivität	7
4. Versuchsbedingungen	7
5. Bestimmung des Transports	7
6. Chlorophyllmessungen	9
7. Phosphatanalyse	9
8. Bestimmung der Ribonuclease-Aktivität	11
III. ERGEBNISSE	11
A. ALTERN UND TRANSPORT VON ^{32}P -PHOSPHAT	11
1. Definition und Verlauf des Alterns	11
2. Korrelatives und zelluläres Altern	12
3. Der "gerichtete Transport"	14
a) ^{32}P -Transport in Blättern	14
b) Der kinetin-induzierte gerichtete Transport in isolierten Blättern	17
c) Der Einfluß des Kinetins auf nichtisolierte Blätter	21
4. Der zeitliche Verlauf der ^{32}P -Mobilisation	22
a) Der Verlauf der Mobilisation in Blättern verschiedenen Alters	22
b) Die Dauer der Sättigung des Lieferbereichs mit ^{32}P	24
c) Der Einfluß von Empfänger- und Lieferbereich auf den Verlauf der Mobilisation	26
d) Die Interpretation der Transport-Zeitkurve	28
B. DER MECHANISMUS DES GERICHTETEN TRANSPORTS	31
1. Der Weg des ^{32}P -Transports	31
2. Der Mechanismus des ^{32}P -Transports	32
a) Kinetin und der Transport von Ionen	33
b) Konkurrenz zweier Mobilisationszentren	35
c) Erklärung der Verteilungskurve des transportierten ^{32}P durch ein Transportmodell	40
3. Die "mobilisierende Kraft"	45

C. AKKUMULIERUNG VON ^{32}P AM KINETINORT UND PHOSPHATSTOFFWECHSEL	47
1. Charakteristik der ^{32}P -Akkumulierung	47
2. Phosphatspiegel und Einbau von transportiertem ^{32}P in verschiedene Fraktionen	48
3. Aufnahme und Einbau von ^{32}P -Orthophosphat	55
D. RIBONUCLEASE-AKTIVITÄT IN ALTERNDEN BLÄTTERN	61
IV. BESPRECHUNG	64
V. ZUSAMMENFASSUNG	72
VI. LITERATURVERZEICHNIS	76

I. EINLEITUNG

Alterserscheinungen treten an Pflanzen in allen Stadien der Entwicklung auf. Während manche Organe noch wachsen, sterben andere schon ab. Dieses Phänomen des "Partialtods" (MOLISCH, 1929) deutet einerseits auf die lockere Organisation der Pflanzen hin; zum anderen aber macht es gerade auch die Beziehung zwischen den einzelnen Teilen deutlich, denn der Verfall der älteren Organe wird meist korrelativ durch die wachsenden jüngeren verursacht (z. B. PAECH und EBERHARDT, 1956; MOTHES, 1960, 1961; LEOPOLD, 1961).

Als eigentlichen Mechanismus dieser Fernwirkung kann man sich dabei einen Stofftransport vorstellen. Es gibt zahlreiche Beispiele für eine Verlagerung organischen und anorganischen Materials während des korrelativen Alterns (Zusammenfassungen; WILLIAMS, 1955; FISCHER 1958 a, 1958 b; MC KEE, 1958). Schon bei der Keimung wird der Embryo von Kotyledonen oder vom Endosperm her versorgt. Diese Speicherorgane gehen zugrunde, wenn man nicht die akkumulierenden jungen Triebe entfernt (VAN TIEGHEM, 1873; MOLISCH, 1929). Ähnliche Konkurrenzverhältnisse, die schon von SACHS (1887) beschrieben wurden, bestehen später in der Entwicklung auch zwischen den einzelnen Blättern und zwischen Speicherorganen (Knollen, Früchte) und Blättern.

Obwohl es lange bekannt war, daß Stoffverschiebungen während des Alterns stattfinden (SWART, 1914; MICHAEL, 1935) und daß eine Blockierung des Transportsystems den Verfall der Blätter verhindern kann (STAHL, 1909; RICHTER, 1915; SCHUMACHER, 1930), wurde die Bedeutung der Korrelationen und des Transports für das Problem des Alterns doch erst kürzlich klar herausgestellt (MOTHES, 1960, 1961; LEOPOLD, 1961), nachdem MOTHES et al. (1959) einen Modellfall entdeckt hatten: Wird 6-Furfurylaminopurin (Kinetin) auf eine begrenzte Fläche eines Tabakblattes aufgetragen, so wird nicht nur das Altern des behandelten Teiles aufgehalten, sondern die Vergilbung des unbehandelten Gewebes beschleunigt. Dabei findet eine zum Kinetinort gerichtete Wanderung von löslichen Verbindungen, wie z. B. von radioaktiven Aminosäuren, statt. Es handelt sich hier um eine Wechselwirkung physiologisch verschiedener Gewebazonen, bei der Material von einem abgebenden zu einem aufnehmenden Bereich verlagert wird. Der ganze Vorgang wurde als eine einzelne physiologische Erscheinung betrachtet und mit dem Namen "Kinetininduzierter gerichteter Transport" belegt (MOTHES und ENGELBRECHT, 1961). LEOPOLD (1961) und MILLER (1961) verwandten den Ausdruck "Mobilisierung", da manche Stoffe in dem abgebenden Gewebe vor ihrem Transport erst beweglich gemacht werden.

Andere Autoren haben seither die Ergebnisse von MOTHES et al. (1959) bestätigt und erweitert. Es wurde gezeigt, daß sich die attrahierende Wirkung der Kinetinbehandlung auch auf ^{14}C -Kohlenhydrate, ^{32}P -Phosphat und ^{35}S -Sulfat erstreckt (ENGELBRECHT, 1961) sowie auch auf die "unphysiologische" α -Aminoisobuttersäure (MOTHES et al., 1961). GUNNING und BARKLEY (1963) arbeiteten mit isolierten Haferblättern und radioaktivem Phosphat, während PENOT (1963) an *Tradescantia*-Sprossen und LEOPOLD und KAWASE (1964) an Bohnenpflanzen feststellten, daß die "mobilisierende" Kraft des Kinetins auch von einem Blatt zum anderen reichen konnte. Viel Beachtung wurde noch dem Einfluß des Kinetins auf den Stoffwechsel geschenkt. Besonders wurde die in früheren Arbeiten angedeutete Stimulierung der Protein- und RNS-Synthese (RICHMOND und LANG, 1957; GUTTMAN, 1957; JENSEN und POLLOCK, 1958; OLSZEWSKA, 1959) weiteruntersucht von THIMANN und LALORAYA (1960), PARTHIER (1961), WOLLGIEHN (1961), PARTHIER und WOLLGIEHN (1961), SUGIURA et al. (1962) und OSBORNE (1962).

Durch die hier beschriebenen Versuche sollte nun die Rolle der Korrelationen im Alterungsprozeß gezeigt und Transportvorgänge dazu quantitativ in Beziehung gesetzt werden. Vor allem wurde auch versucht, am Kinetin-Modell etwas über den Mechanismus des gerichteten Transports zu erfahren und die Wirkung des Kinetins auf den Stoffwechsel alternder Zellen näher zu bestimmen. Junge Maispflanzen schienen wegen ihrer einfachen, regelmäßigen Blattform gut geeignet für Transportmessungen. Radioaktives Phosphat diente meist als Indikator des Stofftransports. Die starke Beta-Strahlung dieses Isotops kann in vivo gezählt werden. Zugleich kann ^{32}P auch benützt werden, um Nucleinsäure- und Energiestoffwechsel zu charakterisieren.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenmaterial:

Maiskörner (*Zea mays* L., Hybrid WF 9 x 38-11) von der Agricultural Seed Improvement Association, Lafayette/Ind., wurden 8 bis 12 Stunden in fließendem Wasser eingeweicht und dann in emmaillierte Behälter mit Vermiculite-Kunsterde gepflanzt. Die Keimlinge wurden in einem Klimaraum bei konstanter Temperatur (24°C), Luftfeuchtigkeit ($60 \pm 10\%$), Beleuchtungsstärke (ca. 20 000 Lux) und Tageslänge (16 Std.) aufgezogen. Für die meisten Experimente wurden die Primärblätter 10 bis 13 Tage alter Pflanzen benützt. In diesem Entwicklungszustand waren sie voll ausgewachsen und zeigten noch keinen Verlust von

Chlorophyll. Sie wurden dicht an der Ligula abgeschnitten.

2. Radioisotope:

^{32}P -Phosphat (carrierfrei), $^{22}\text{NaCl}$ (carrierfrei), $^{86}\text{RbCl}$ (spezifische Aktivität: 0,02 mc/mM) und K^{131}J (carrierfrei) stammten vom Oak Ridge National Laboratory, Tenn., USA. Die stark sauren Lösungen wurden vor Benützung neutralisiert.

3. Messung der Radioaktivität:

Die negative und positive (^{22}Na) Betastrahlung war bei allen Isotopen stark genug, um mit einem Geigerzählrohr (Nuclear Chicago) bei konstanter Entfernung gezählt zu werden. Wo genauere Messungen notwendig waren, wurde ein Durchflußzählrohr der Firma PACKARD, La Grange/III., mit einem Baird Atomic Scaler benützt. Die längste Auflösungszeit der Geräte betrug 125 μsec und beeinflusste nur Aktivitäten von mehr als 11 000 ipm (Korrektur: + 1 %). Die Ergebnisse wurden weiterhin korrigiert hinsichtlich der Leerzählung und des Zerfalls. Eigenabsorption war geringfügig oder bei in-vivo-Messungen ungefähr gleich für Kontrolle und Versuch.

4. Versuchsbedingungen:

Die Primärblätter wurden nach gleichem Aussehen (Form und Farbe) auf entsprechende Versuchsgruppen verteilt. Sie wurden dann auf Glasstücken in bedeckten, durchsichtigen Perspex-Kästen ausgelegt, deren Boden mit wassergetränktem Papier bedeckt war, um die Luft mit Feuchtigkeit zu sättigen. Während der Versuchszeit befanden sich die Kästen in einem Raum mit schwacher Beleuchtung (ca. 500 Lux), da hohe Intensitäten den Alterungsprozeß zu sehr beschleunigen. Testsubstanzen wie Kinetin (meist 30 mg/l = $1.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) wurden in Lösungen zusammen mit Filterpapierstückchen von bestimmter Größe aufgetragen, gleiches Volumen auf gleicher Fläche. Zusatz von "Tween 80" (Polyoxyäthylensorbitan-monooleat, 0,01 %) zu den Lösungen erleichterte die Benetzung der Blattoberfläche.

5. Bestimmung des Transports:

Die Blätter nahmen markierte Substanzen, meist ^{32}P -Phosphat, von kleinen Tropfen ihrer Lösung auf, die mit einer Agla-Mikropipette an bestimmten, mit Tusche bezeichneten Stellen der Blattoberseite aufgetragen wurden (ca. 1 bis 5 μl). Später beschriebene Kontrollversuche (Abb. 29) zeigten, daß das ^{32}P sich dabei nicht durch kapillaren Sog oder andere physikalische Kräfte ausbreitete.

Die Radioaktivität, die schließlich im Blatt wegtransportiert wurde, konnte nach verschiedenen Transportzeiten nach zweierlei Methoden gezählt werden: Entweder wurde die longitudinale Verteilung der Isotopen im Blatt an einem "Forro-Chromatogram-Scanner" bestimmt, indem das Blatt zwischen Wachspapierstreifen befestigt, über den Schlitz des Zählrohrs gezogen und das "Profil" der Radioaktivität mit einem rektilinearen Schreiber registriert wurde (Abb. 1a); oder aber die Gesamtmenge der transportierten Aktivität wurde hinter einer Abschirmung aus Pyrex-Glas mit einem Geigerzähler gemessen (Abb. 1b;).

6. Chlorophyllmessungen:

Änderungen des Chlorophyllgehalts konnten mit dem System einer "Integrierenden Kugel" ungefähr quantitativ festgestellt werden, ohne das Blattgewebe zu zerstören. Es war an einem "Spectronic 20" - Spectrophotometer der Firma BAUSCH und LOMB angebracht und maß die Intensität der Reflexion bei 665 m μ . In anderen Fällen wurde das Chlorophyll mit kochendem Alkohol (80%) extrahiert und die Extinktion bei 665 m μ in einem Beckmann-Model-B-Spectrophotometer gemessen.

7. Phosphatanalyse:

a) Bestimmung des Orthophosphats und des Gesamtphosphats:

Orthophosphat wurde nach der Methode von MARTIN und DOTY (1949) in saurer Lösung in den Ammoniummolybdatkomplex übergeführt. Dieser wurde durch eine Mischung von Isobutanol und Benzol (1/1, v/v) extrahiert. Im Extrakt wurde die ^{32}P -Aktivität und nach Reduktion des Komplexes mit SnCl_2 der Phosphatgehalt ermittelt. Das Gesamtphosphat wurde nach Veraschung mit 60% Überchlorsäure bei 150°C auf die gleiche Weise bestimmt.

b) Extraktion und Fraktionierung der säurelöslichen Phosphate:

Ungefähr 0,5 g frisches Blattmaterial wurde auf Kohlensäureeis gefroren, in einem Porter-Elvehjem-Homogenisator mit 1 ml Aceton bei der Temperatur der festen Kohlensäure (-78°C) zerrieben, um Phosphataseaktivitäten gering zu halten. Nach Zugabe von 2 ml eisgekühlter Trichloressigsäure (7%; "TCE") wurde die Mischung bei 0°C fertig homogenisiert, mit weiteren 3 ml TCE quantitativ in ein Zentrifugenglas übergeführt und ca. 5 Min. bei ungefähr 5 000 g zentrifugiert. Das Überstehende wurde dekantiert; der säureunlösliche Satz wurde durch wiederholtes Suspendieren mit Hilfe eines Rührers und Zentrifugieren bei 0°C gewaschen; zuerst mit 4 ml TCE, dann mit 4 ml 50% Alkohol / 3% TCE, schließlich wieder mit 4 ml TCE. Das Überstehende wurde vereinigt, durch Glas-

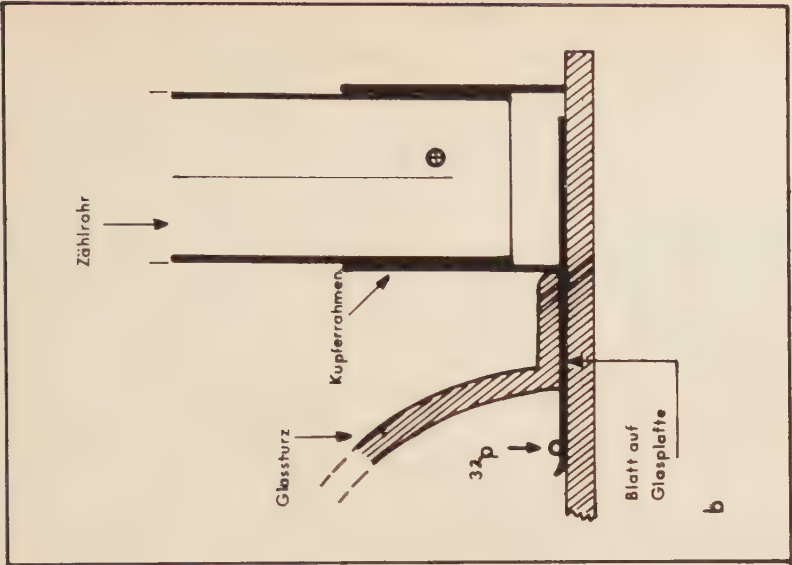
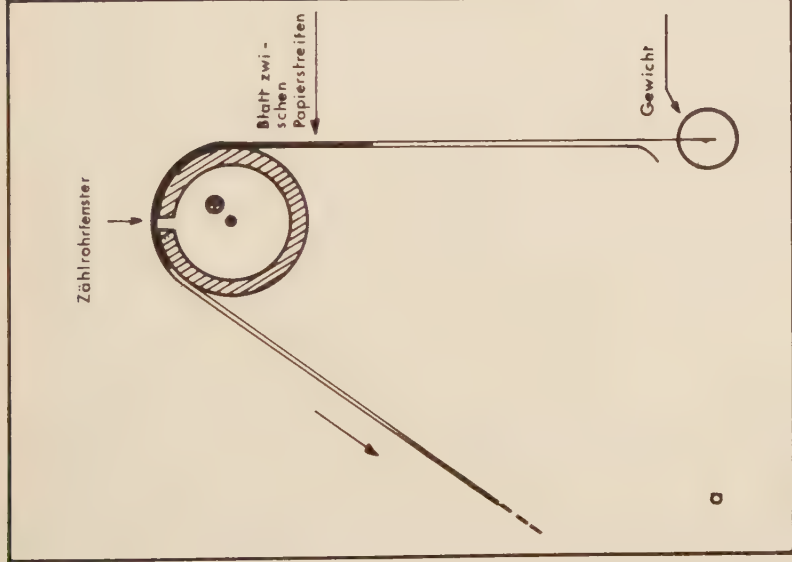


Abbildung 1: Messung des ^{32}P -Transports.

wolle filtriert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Die Nucleotide wurden daraus nach CRANE und LIPMANN (1953) durch zweimaliges Schütteln mit 0,2 g Aktivkohle Norit A (mit Säure gewaschen) sofort entfernt. Der Phosphatgehalt der übrigen, durch Whatman No. 42 - Papier gefilterten Lösung wurde analysiert nach Orthophosphat und organischem Phosphat (zum größten Teil Zuckerphosphat). Die Kohle wurde mit Wasser ausgewaschen und das säurelabile Nucleotidphosphat mit 1 N HCL (7 Min. bei 100°C) abgespalten (LELOIR und CARDINI, 1957). Mit 50 % Alkohol / 1 % Ammoniak wurden schließlich die Nucleosidmonophosphate abgelöst. Phosphatbestimmungen erfolgten in beiden Fraktionen nach der obenerwähnten Methode.

c) Fraktionierung der säureunlöslichen Phosphate:

Der säureunlösliche Rückstand wurde einmal bei Zimmertemperatur mit 80 % Alkohol gewaschen. Dann wurde er zweimal mit 5 ml Alkohol/Äther (3/1, v/v) und einmal mit 5 ml Methanol/Chloroform (4/1, v/v; SCHMIDT und THANNHAUSER, 1945) jeweils bei Siedetemperatur einige Minuten lang extrahiert. Der Extrakt wurde eingedampft und sein Phosphatgehalt bestimmt ("Lipide"). Der nun weiße Rückstand wurde weiterhin analysiert nach der Methode von SCHMIDT und THANNHAUSER (1945), die von MARKHAM (1955) und FRITZ und RÖTTGER (1963) für Pflanzenmaterial als die bestgeeignete befunden worden war. Ribonucleinsäure (RNS) wurde durch Inkubation mit 0,5 N KOH (20 Std. bei 37°C) in Mononucleotide gespalten. Langsames Zugeben von Überchlorsäure unter Kühlung bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M führte dann zu einem Niederschlag von Kaliumperchlorat und Desoxyribonucleinsäure (DNS), der nun gewaschen und analysiert wurde. Freies anorganisches Phosphat im Löslichen stammte größtenteils von "Phosphoproteinen", und die Differenz zwischen Gesamt- und Orthophosphat im Löslichen stellte die RNS-Fraktion dar.

d) Chromatographie säurelöslicher Phosphate:

Eine Übersicht über die ungefähre Verteilung der löslichen ³²P-Aktivität wurde manchmal auf einem eindimensionalen Chromatogramm erlangt. Die TCE des Extrakts wurde mit Äther ausgeschüttelt und die wässrige Phase auf Whatman No. 1-Papier aufgetragen, das vorher mit 1% Oxalsäure und Wasser gewaschen worden war (BENSON, 1955). Das Chromatogramm wurde dann absteigend entwickelt mit einer Mischung von tert. Butanol / Pikrinsäure / Wasser (100/2/20) nach HEITEFUSS (1961).

8. Ribonuclease-Aktivität:

Diese Bestimmung erfolgte im allgemeinen nach WILSON (1963) und WILSON und SHANNON (1963). Blätter wurden in der Kälte mit 2 vol. Tris/HCl-Puffer (0.025 M, pH 7.5) zerrieben, der noch KCl enthielt (0.5 M). Nach Zentrifugieren bei niedriger Geschwindigkeit wurde im Überstehenden die Enzymaktivität bestimmt: 0.5 ml des Homogenats wurden mit 2.5 ml einer gepufferten Hef-RNS-Lösung (2 mg/ml; 0.2 M KCl; 0.1 M Phosphat; End-pH: 5,8) bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0.5 ml von 25 % Perchlorsäure / 0.75 % Uranylacetat beendet, der Niederschlag abzentrifugiert und die Konzentration der löslichen Spaltprodukte (i.e. Nucleotide) in einem Beckman-DU-Spektrophotometer gemessen. Eine Änderung in der Differenz der Extinktionen $E_{260}-E_{290}$ um den Wert 0.1 wurde als Einheit der Enzymaktivität angenommen. Bei der Kontrolle wurde das Homogenat erst unmittelbar vor Beendigung der Reaktion zum Substrat gegeben.

Spaltung endogener RNS wurde nach einem Verfahren bestimmt, das in ähnlicher Weise von CHERRY et al. (1962) angegeben wurde: Blätter wurden in der Kälte in Puffer zerrieben (0.25 M Saccharose; 0.1 M Phosphat; $5 \cdot 10^{-4}$ M $MgSO_4$ 0.1 M KCl). Die Ribonucleaseaktivität des Homogenats wurde als die Abnahme der endogenen RNS nach 30 Min. Inkubation bei 30°C gemessen: Der Perchlorsäure/Uranylacetat - Niederschlag wurde mit 0.2 M $HClO_4$ gewaschen, mit 80% Alkohol und heißem Alkohol/Äther (3/1, v/v) extrahiert und die RNS hydrolysiert durch 0.6 M $HClO_4$ bei 70°C, 40 Min. Nach Zentrifugieren wurde der Nucleotidgehalt des Überstehenden spektrophotometrisch bestimmt (s. oben).

III. ERGEBNISSE

A. ALTERN UND TRANSPORT VON ^{32}P -PHOSPHAT

1. Definition und Verlauf des Alterns:

Jeder Schritt der Entwicklung ist, genau genommen, ein Alterungsprozeß (KÜSTER, 1921). Der Ausdruck "Altern" wird hier jedoch nur im engeren Sinne auf das letzte Lebensstadium angewandt, das bei Pflanzen besonders deutlich durch den Abbau des Chlorophylls gekennzeichnet ist. Dieses Kriterium ist insofern bedeutsam, als es die photosynthetische Leistung oder zumindest deren Verlust anzeigt und außerdem mit dem Proteingehalt in engem Zusammenhang steht (MICHAEL, 1935). Damit kann der Chlorophyllgehalt der Zelle, dessen Änderung leicht beobachtet oder quantitativ bestimmt werden kann, als Maß ih-

rer Lebensfähigkeit gelten.

Maispflanzen, die ohne Nährsalze aufgezogen werden, altern frühzeitig. Die Vergilbung setzt schon ungefähr zwei Wochen nach Keimungsbeginn ein. In Abb. 2, welche drei Pflanzen in verschiedenen Stadien des Alterns zeigt (von links nach rechts; ca. 2, 3 und 4 Wochen alt; Aufnahme mit Polaroidkamera bei Rotlicht, ca. 1/4 nat. Gr.) wird der Gesamtverlauf ersichtlich: Der Abbau des Chlorophylls beginnt an der Spitze des Primärblattes, ergreift das Sekundär- und später das Tertiärblatt, wobei er jeweils von der Spitze zur Basis hin vorrückt.

2. Korrelatives und zelluläres Altern:

Nach MOTHES (1960) kann diese Bildung eines Chlorophyll- oder Alterungsmusters korrelativ geregelt werden. Die Beziehungen zwischen den verschiedenen



Abbildung 2: Der Verlauf des Alterns bei Maispflanzen

Organen und Gewebeteilen der Maispflanzen, insbesondere ihre Bedeutung für den Verlauf des Alterns im Primärblatt, sollten deshalb in einem Versuch dargestellt werden.

Dazu wurden Pflanzen in verschiedene Teile zerlegt und die Reflexion bei 665 m μ an vergleichbaren Stellen von Primärblättern in verschiedenen Versuchsanordnungen gemessen: A: zur Zeit der Isolierung; B, C und D nach einer Alterungszeit von 60 Stunden; davon B: am Blatt der intakten Pflanze, C: an ausgestanzten Scheiben, die auf feuchtem Filterpapier aufbewahrt worden waren, D: am isolierten Blatt.

Abb. 3 enthält die Meßwerte; Abb. 4 zeigt im Photo einige Beispiele solcher Primärblätter (A: Blatt der intakten Pflanze; B: isoliertes Blatt; C: aufgeteiltes Blatt; D: Blatt mit Kinetinfleck, vgl. S. 18).

Die Blattscheiben alterten ohne Korrelationen ("zelluläres" Altern); sie verloren ihr Chlorophyll ungefähr gleich schnell (Abb. 3/C). Während die entsprechenden Gewebeteile im isolierten Blatt rascher an der Spitze vergilbten als an der Basis, (Abb. 3/D; Abb. 4/B), wurden sie fast im ursprünglichen Zustand (Abb. 3/A) erhalten, wenn sie mit der ganzen Pflanze in Verbindung blieben (Abb. 3/B; Abb. 4/A). Anscheinend ist dies der konservierende Einfluß der Wurzel, (LINDEMUTH, 1904; CHIBNALL, 1954; MOTHES und ENGELBRECHT, 1956; KULAYEVA, 1962).

Wird ein Blatt aus dem Ganzen herausgetrennt, dann zeigt also der basale Teil die Fähigkeit, auf Kosten der Spitze zu überleben. Diese "Konkurrenzkraft" ist dabei nicht auf einen begrenzten Teil der Basis konzentriert, sondern steigt von der Spitze her kontinuierlich an; denn wenn ein Blatt durch Schnitte an beliebigen Stellen in mehrere Stücke geteilt wird, so erscheint derselbe Gradient des Alterns in jedem Einzelabschnitt (Abb. 4/C). Im Verband der ganzen Pflanze jedoch kommt dieser besondere korrelative Einfluß nicht zur Geltung. Er wird überdeckt oder vielleicht ganz aufgehoben.

3. Der "gerichtete Transport"

Solche Korrelationen beruhen nach MOTHES (1960) auf Transportvorgängen. Man stellt sich vor, daß verschiedenes Stoffmaterial in der Spitzenregion der Blätter mobilgemacht, zur Basis geschafft und dort akkumuliert wird ("gerichteter Transport"; "Mobilisation")

a) ³²P-Transport in Maisblättern:

Durch radioaktives Phosphat sollten nun die Stoffverlagerungen in alternden Blättern angezeigt werden.

Tröpfchen einer neutralisierten Lösung von ³²P-Phosphat (2 μ l mit 200 μ c) wurden neben Tuschemarken auf die Blattoberfläche abgeschnittener und nichtisolierter Blätter aufgesetzt. Nach 20 Stunden

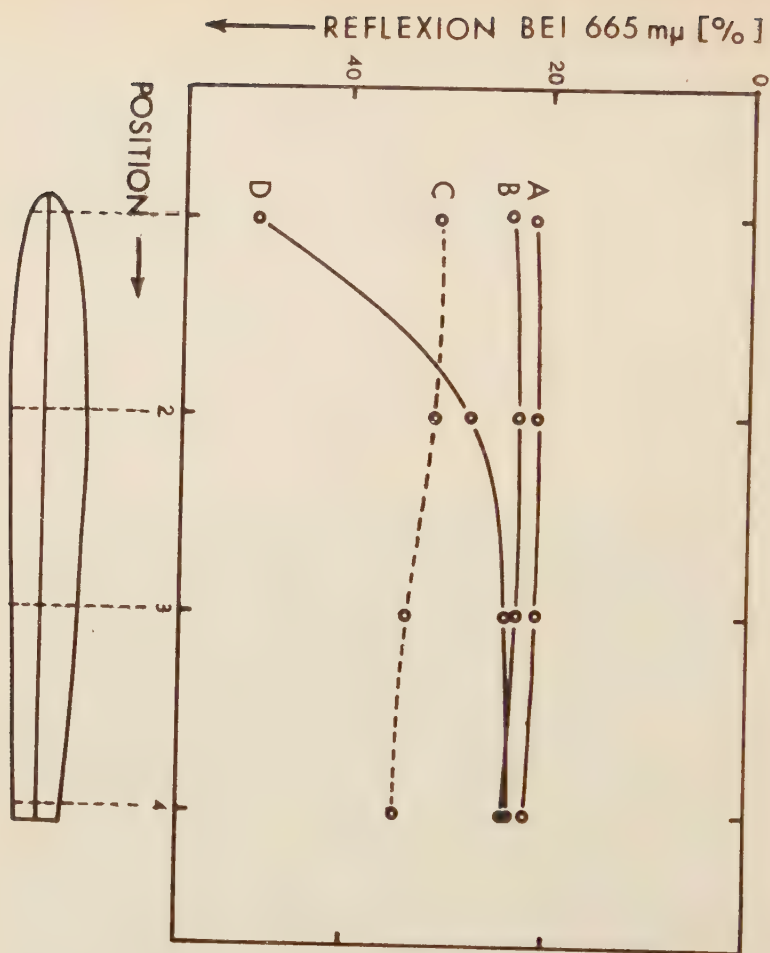


Abbildung 3: Korrelatives und zelluläres Altern.

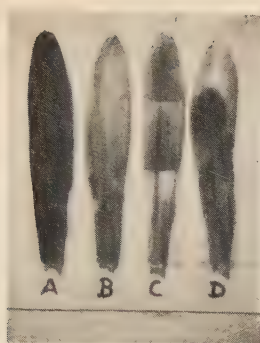


Abbildung 4: Korrelatives Altern der Primärblätter

Transportzeit wurden die Fütterungsstellen ausgestanzt und die Radioaktivität am Scanner registriert (Abb. 5).

Das radioaktive Phosphat war nach 20 Stunden in allen abgeschnittenen Blättern (Abb. 5b) zur Basis hin asymmetrisch verteilt. Standen die Blätter jedoch in Verbindung mit dem übrigen Teil der Pflanze, so war bei Sekundär- und Tertiärblättern der Transport zur Spitze hin bevorzugt (Abb. 5a). Ein weiterer Versuch zeigt etwas ausführlicher den "gerichteten Transport" von ^{32}P nach verschiedenen Transportzeiten.

Das Profil der ^{32}P -Radioaktivität in einem abgeschnittenen Primärblatt wurde wiederholt am Scanner aufgezeichnet. Der ^{32}P -Tropfen wurde jeweils vor den Messungen mit Filterpapier abgesaugt und hinterher wieder ersetzt. Wegen der Verfallskorrektur wurden die Ausschläge des Schreibers in zahlenmäßige Werte umgeformt. Sie sind in Abb. 6 wiedergegeben.

Diese Ergebnisse entsprechen der Annahme, daß der zur Basis hin "gerichtete Transport" der Grund des korrelativen Alterns ist. Auch die Verteilungskurven, die an nichtisolierten Blättern erhalten wurden (Abb. 5a), lassen sich in dieses Konzept einordnen; denn es liegt ja nahe, daß die alterungshemmende Wirkung der Wurzeln in einer Hemmung oder gar Umkehrung des basalen Transportes zum Ausdruck kommt. Das überzeugendste Beispiel des korrelativen Alterns und der entsprechenden Transportvorgänge ist aber die von MOTHES et al. (1959) entdeckte Induktion des gerichteten Transports durch Kinetin. Da sie auch das beste experimentelle Hilfsmittel für die Bearbeitung des Mobilisationsproblems darstellt, konzentrieren sich die folgenden Untersuchungen auf den Kinetineffekt an primären Maisblättern.

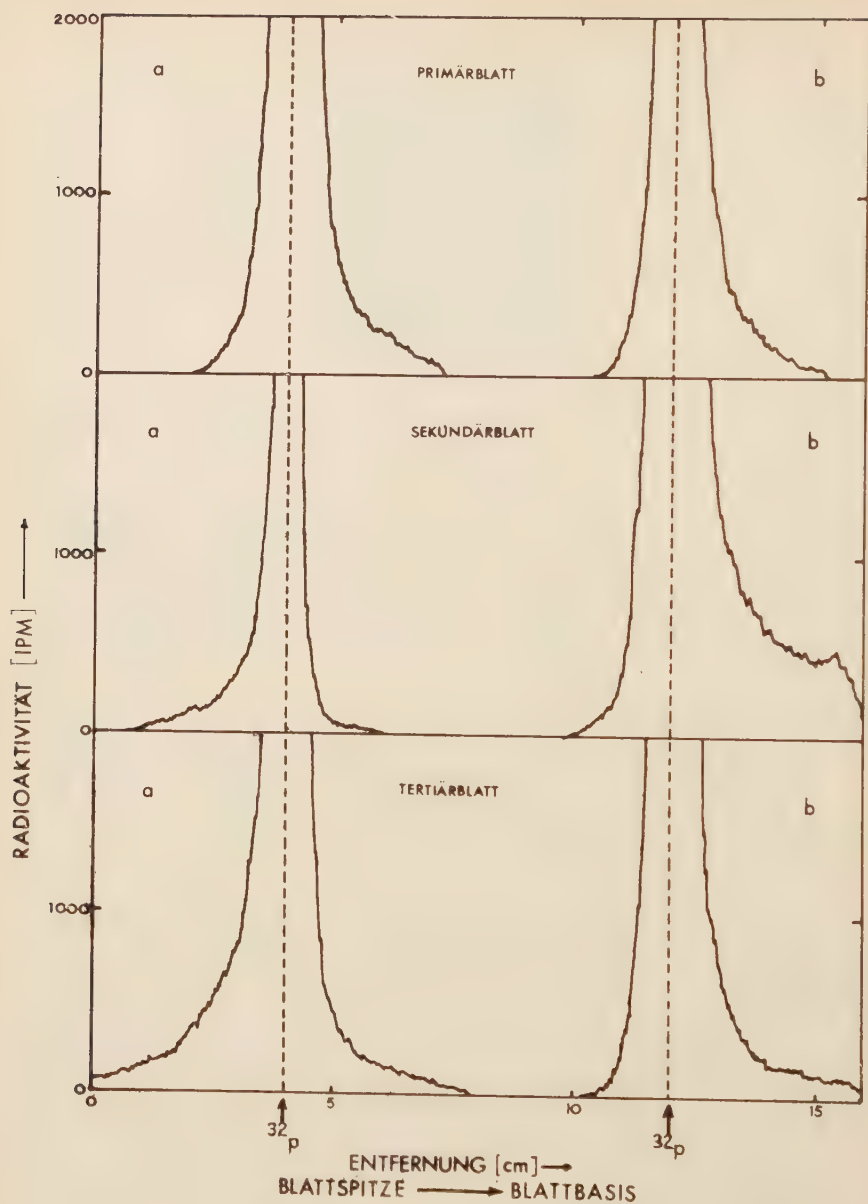


Abbildung 5: ^{32}P -Transport in isolierten und nichtisolierten Blättern.

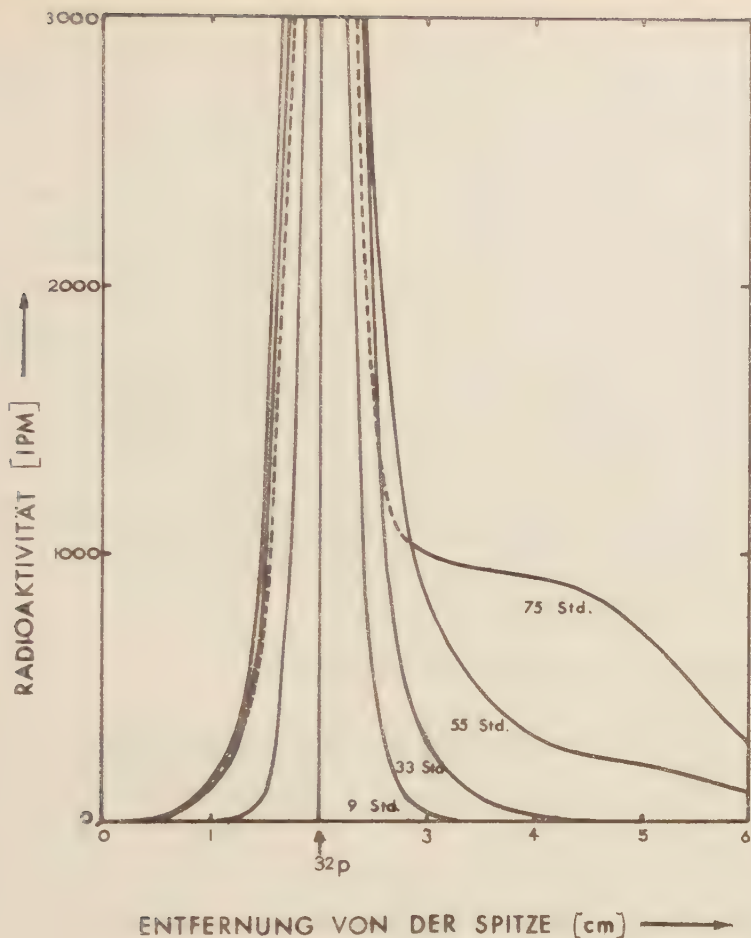


Abbildung 6: Gerichteter Transport von ^{32}P im Primärblatt

b) Der Kinetin-induzierte gerichtete Transport in isolierten Blättern

Die Lebensdauer von Blattgewebe vieler Pflanzen wird durch Behandlung mit Kinetin (=6-Furfurylaminopurin) verlängert (RICHMOND und LANG, 1957; MOTHES et al., 1959; OSBORNE und MCCALLA, 1959; KULAYEVA, 1962). Auch Maisblätter reagieren in der gleichen Weise. Legt man zum Beispiel ausgestanzte Blattscheiben in Kinetinlösung, so wird die Vergilbung schon durch eine Wirkstoffkonzentration von 0.001 mg/l gegenüber der Wasserkontrolle deutlich ver-

zögert. Die für die Erhaltung des Chlorophylls wirksamste Konzentration ist $0,1 \text{ mg/l} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. Damit liegt das Optimum im gleichen Konzentrationsbereich wie beim Blattwachstumtest (KURASHI und OKUMURA, 1956), beim Chlorophylltest (OSBORNE und McCALLA, 1961) und bei der Förderung des Einbaus von Aminosäuren in Tabakblattproteine (PARTIER, 1961).

Da das Kinetin im Gewebe praktisch unbeweglich festsetzt an der Stelle, wo es aufgetragen wurde (MOTHES et al., 1959; CHVOJKA et al., 1961) wird es möglich, eine örtlich begrenzte physiologische Veränderung in einem Zellkomplex anzubringen. An kinetinbehandelten Stellen isolierter Maisblätter entstehen "grüne Inseln" (Abb. 4/D), deren Größe bei gleicher Auftragsfläche und gleichem Volumen der Lösung von der Konzentration des Kinetins abhängt. Ähnlich wie der natürliche Mobilisationsgradient des Maisblattes entfaltet nun aber auch das Kinetinzentrum eine korrelative Tätigkeit. Zunächst macht diese sich in der schnelleren Vergilbung der Blattspitze bemerkbar (Tabelle I).

Primärblätter wurden nach gleichem Aussehen zu Paaren geordnet, von denen jeweils ein Blatt in der Mitte Kinetin (30 mg/l), das andere Wasser erhielt. Dreißig Stunden später wurde die Reflexion bei $665 \text{ m}\mu$ an der Blattspitze gemessen.

Tabelle I: Korrelatives Altern der Spitzenregion

Anzahl der Blattpaare	Durchschnittliche Reflexion (%)		
	mit Kinetinzentrum	ohne Kinetinzent.	mit/ohne
10	28,4	25,3	$1,10 \pm 0,04$

Später, nach ungefähr drei Tagen, tritt unterhalb des Kinetinorts auch eine Vergilbung der Basis deutlich hervor.

Dem Konzept der "Mobilisation" entsprechend ist ein solcher Kinetinort das Ziel eines induzierten Stofftransports (MOTHES et al., 1959; MOTHES, 1960, 1961). Wenn die Verteilung transportierter ^{32}P -Radioaktivität in einem Maisblatt untersucht wird, das in der Mitte ein Kinetinzentrum besitzt (Scanner-Methode wie in Abb. 6), so fällt auf, daß das ^{32}P dort akkumuliert wird (Abb. 7). Man könnte sich aber vorstellen, daß eine einfache Blockierung des Transports eine ähnliche Erscheinung hervorrufen könnte. Was den kinetininduzierten Transport von einem bloßen Stau unterscheidet, wäre jedoch eine Stimulierung des ^{32}P -Transports zum Kinetinort hin.

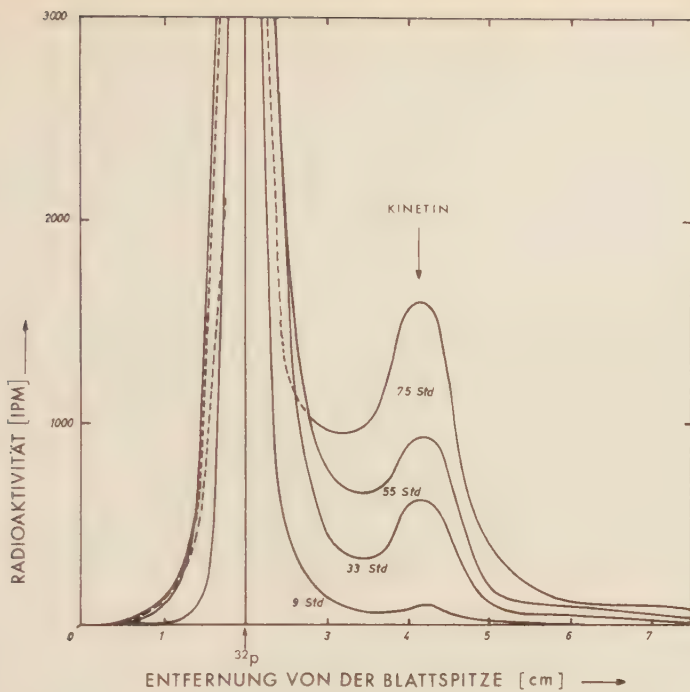


Abbildung 7: Akkumulation von ^{32}P am Kinetinort.

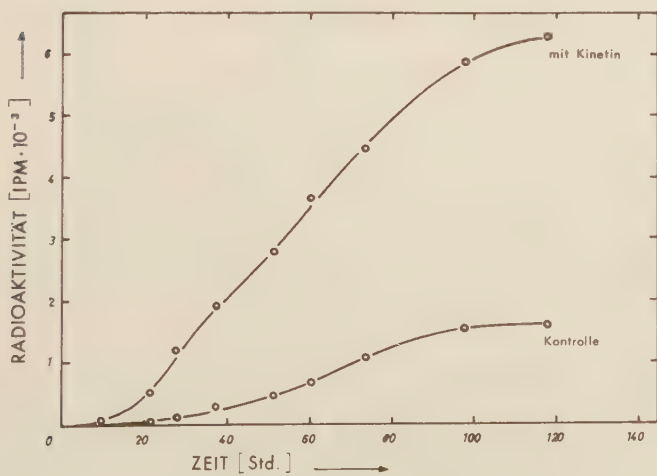


Abbildung 8: Stimulierung des ^{32}P -Transports durch Kinetin



Zwei gepaarte Gruppen von Primärblättern erhielten ^{32}P an der Spitze und Kinetin (30 mg/ml) bzw. Wasser in der Mitte. Die Radioaktivität, die hinter einer bestimmten gekennzeichneten Linie von der ^{32}P -Stelle her eintraf, wurde mit einem Geigerzählrohr nach verschiedenen Transportzeiten gezählt. Die Werte wurden nach Leerzählung und Zerfall korrigiert.

Die aus je zehn Messungen erhaltenen Durchschnittswerte sind in Abb. 8 dargestellt. Offensichtlich wird die gesamte Transportleistung unter dem Einfluß eines Kinetinzentrums stark gefördert, in diesem Experiment um ungefähr 300%. Diese Größe ist jedoch wegen der starken Variabilität nicht gesichert, wie es an Einzeldaten eines anderen Versuchs in Tabelle II ersichtlich ist. Eine Transportstimulierung findet aber ohne Ausnahme in jedem Blattpaar statt.

Tabelle II: Erhöhung der ^{32}P -Transportleistung durch Kinetin.

Blattpaar Nr.	Transportiertes ^{32}P (ipm)		
	mit Kinetin	ohne Kinetin	mit/ohne
1	3200	171	18.7
2	3080	841	3.7
3	3800	1400	2.7
4	2910	231	12.6
5	4250	191	22.4
6	5040	1086	4.6
7	5160	475	10.9
8	2240	595	3.8
9	1013	673	1.5
10	2500	435	5.7

Bemerkenswert ist schließlich noch der Befund, daß weder das Ausmaß der Transportstimulierung noch die Form des akkumulierten "Gipfels" auf der Scannerkurve von der Konzentration der Kinetinlösung abhängt. Es besteht lediglich eine leichte Tendenz, daß eine Konzentration von 30 mg/l wirksamer ist als 3 oder 300 mg/l.

Die festgestellte Erhöhung der gesamten Transportleistung durch Kinetin kann nun speziell die Folge einer Beschleunigung sein; sie könnte aber auch auf eine stärkere Beladung des Transportsystems, also auf eine Zunahme der Transportkapazität zurückgeführt werden. Die Geschwindigkeit des ^{32}P -Transports sollte deshalb in Blättern mit und ohne Kinetinzentren gemessen werden.

Gepaarte Gruppen von Blättern erhielten Kinetin bzw. Wasser in der Mitte. Nach 18 Stunden wurden ^{32}P -Tröpfchen unterhalb der Blattspitzen aufgesetzt. Mit einem GM-Zählrohr wurde die Zeit festgestellt, welche die Radioaktivität zum Durchlaufen einer bestimmten Strecke benötigte (Tabelle III).

Tabelle III: Beschleunigung des ^{32}P -Transports durch Kinetinzentren

Versuch Nr.	Durchschnittsgeschwindigkeit (mm/Std)		Untersch. z. Kontrol- le (mm/Std.)
	mit Kinetin	ohne Kinetin	
1	1.6	1.1	+ 0.5 $\pm$ 0.1
2	4.1	2.7	+ 1.4 $\pm$ 0.3

Trotz der hohen Fehlergrenze kann eine Beschleunigung des Transports durch Kinetinzentren (um ca. 50%) wenigstens qualitativ als sicher gelten, wenn man nicht wegen einer unbestimmbaren Attenuation der ^{32}P -Front die Meßmethode überhaupt ablehnt. Die Zunahme der Geschwindigkeit allein dürfte aber nicht ausreichen, um die Gesamtstimulierung des Transports durch Kinetin zu erklären.

Durch diese Versuche ist der kinetin-induzierte gerichtete Transport von ^{32}P , der auch mit Hilfe der Autoradiographie an Tabakblättern von ENGELBRECHT (1961) und mit der Scanner-Methode an Haferblättern von GUNNING und BARKLEY (1963) gezeigt wurde, nun etwas eingehender quantitativ bestimmt. Dabei sind eben an der kinetin-induzierten Korrelation die wesentlichen Kennzeichen des gerichteten Transports besonders klar zu erkennen. Sie seien noch einmal herausgestellt:

- 1.) Substanzen wie zum Beispiel radioaktive Phosphate werden am mobilisierenden Zentrum akkumuliert.
- 2.) Mobilisierende Zentren attrahieren Stoffe, d.h. sie induzieren oder fördern den auf sie gerichteten Transport, wobei es sich zum Teil um eine Beschleunigung handelt.

Der Transporteffekt tritt zusammen mit einer Beschleunigung des Chlorophyllabbaus der abgebenden Blattbezirke auf; eine Tatsache, die für den engen Zusammenhang zwischen Stofftransport und korrelativem Altern spricht.

c) Der Einfluß des Kinetins auf nichtisolierte Blätter:

Die oben getroffenen Feststellungen zur Wirkung des Kinetins auf Maisblattgewebe gelten übrigens nur für isolierte Blätter. An intakten Pflanzen vermag das Kinetin keine Chlorophyllinseln zu produzieren. Auch nach dem Bericht von

MOTHES (1961) ruft Kinetin an Tabakblättern erst dann einen Chlorophylleffekt hervor, wenn diese abgeschnitten werden. Der kritische Umstand ist dabei die Anwesenheit der Wurzel (KULAYEVA, 1962). Es läge nun nahe, anzunehmen, daß bei diesen nicht-alternden Blättern nur der kontrastierende Abbau des Chlorophylls fehlt. Doch wurde gefunden, daß an Kinetinstellen intakter Maispflanzen keine Anreicherung von transportiertem ^{32}P zustandekommt. Dies läßt vermuten, daß das Kinetin seine typischen Veränderungen des Stoffwechsels an ganzen Pflanzen nicht zu induzieren vermag.

4. Der zeitliche Verlauf der ^{32}P -Mobilisation

Die Verlagerung von Phosphaten während des Alterns ist lange bekannt, so zum Beispiel ihre "Rückwanderung aus herbstlichen Blättern" (SWART, 1909). Das in die Blattzellen aufgenommene ^{32}P wird aber in die verschiedenen Phosphate eingebaut und markiert somit Bestandteile der Pflanzen, die natürlicherweise am Mobilisationsprozeß teilnehmen. Man kann deshalb erwarten, daß der Transport von ^{32}P ein gültiges Maß abgibt für die korrelativen Beziehungen zwischen den aufnehmenden "mobilisierenden Zentren" und den Lieferbereichen. Er wurde in den folgenden Versuchen dazu benützt, die Kinetik dieser Vorgänge, die wahrscheinlich die Basis des korrelativen Alterns darstellen, zu untersuchen.

a) Der Verlauf der Mobilisation in Blättern verschiedenen Alters

Elf Tage und fünfzehn Tage alte abgeschnittene Primärblätter erhielten ^{32}P kurz unterhalb der Blattspitze und Kinetin, bzw. Wasser, an der Basis. Das in konstantem Abstand von der Aufnahmestelle sich ansammelnde ^{32}P wurde wie im Versuch der Abb. 8 (vgl. Schema S. 20) zu verschiedenen Zeiten gezählt. Einzelne Mobilisationskurven von jüngeren Blättern sind in Abb. 9, von älteren Blättern in Abb. 10 wiedergegeben.

Im allgemeinen haben die Kurven eine Sigmoidgestalt. Zwischen den einzelnen Blättern treten sehr starke Schwankungen der Meßwerte auf. Da die durch Kreise gekennzeichneten Wendepunkte der Kurven umso später liegen, je schwächer die Blätter mobilisieren, ist die Variabilität wohl mehr physiologisch als durch Unterschiede in der Behandlungstechnik bedingt. Nur durch sorgfältige Paarung gleich aussehender Blätter können vergleichbare Gruppen für quantitative Versuche gewonnen werden.

Die Wendepunkte der Kurven liegen bei dem jüngeren Material zwischen 80 und 100 Stunden, bei dem älteren aber zwischen 20 und 40 Stunden. Der nach dem Abschneiden der Blätter einsetzende Alterungsprozeß läuft also bei jüngeren Blättern viel langsamer ab als bei älteren. Auch die Verstärkung der mobilisierenden Aktivität durch ein Kinetinzentrum kann ihn nicht wesentlich verkürzen.

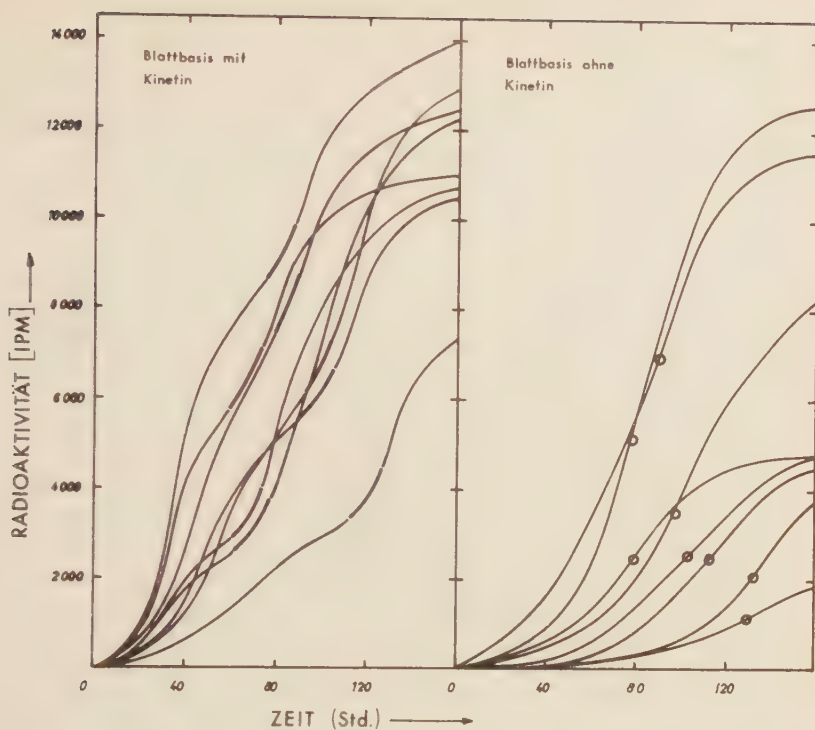


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der ^{32}P -Mobilisation bei elf Tage alten Primärblättern

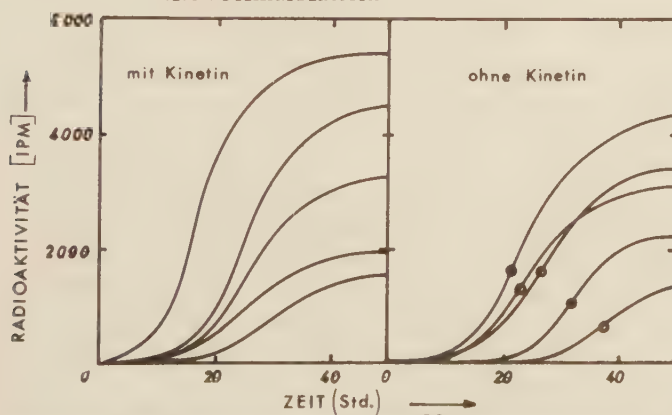


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der ^{32}P -Mobilisation bei fünfzehn Tage alten Primärblättern

Im übrigen wird aber der Verlauf der Mobilisation bei jüngeren Blättern durch Kinetin dahingehend verändert, daß er nicht eine, sondern zwei Perioden einer gesteigerten Geschwindigkeit aufweist. Der Beginn der zweiten Phase ist zur besseren Trennung von der ersten in Abb. 9 mit dickeren Strichen hervorgehoben.

Auffallend ist schließlich noch die Tatsache, daß die absolute Menge des transportierten ^{32}P bei jüngeren Blättern die bei älteren Blättern um mehr als das Doppelte übersteigt.

b) Die Dauer der Sättigung des Lieferbereiches mit ^{32}P :

Für eine Interpretation der Zeitkurven des ^{32}P -Transports (S. 28) war besonders der anfänglich zunehmende Anstieg von Interesse. Er kann ein Anwachsen der Mobilisationsrate während des Alterns bedeuten; er könnte aber auch nur darauf zurückzuführen sein, daß markierte Phosphate nicht sofort nach Aufsetzen der Lösung in gleichbleibenden Mengen dem Transport zur Verfügung gestellt werden können. Man muß damit rechnen, daß der liefernde Bereich eine gewisse Zeit zur Sättigung mit ^{32}P benötigt.

Um die Größenordnung dieser Zeitspanne herauszufinden, wurden etwas ältere Blätter (14 Tage alt) mit Kinetinzentren versehen. ^{32}P wurde erst nach 12, bzw. 20 Stunden (Kurve A, bzw. B) zugegeben, also zu einer Zeit, da die Mobilisationskurve sonst schon fast konstant und steil anstieg (Abb. 10). Der Transport wurde dann mit einem Geigerzählrohr gemessen.

Man konnte nun also erwarten, daß eine nichtlineare Anfangsperiode der Mobilisation allein auf die langsame Equilibration der Lieferregion mit ^{32}P zurückzuführen war. Durchschnittswerte der ^{32}P -Mobilisation sind in Abb. 11 aufgetragen. Wieder erscheint ein nichtlinearer Anstieg der Kurven; die Steigung wird erst ungefähr 10 Stunden nach der ^{32}P -Fütterung konstant. Anscheinend ist das die obere Grenze der gesuchten Equilibrationszeit. Sie ist aber kürzer als der gewöhnliche nichtlineare Beginn der Mobilisation, der bei gleichzeitigem Auftragen der Isotopen- und Kinetinlösung in alten Blättern 20, in jungen Blättern mehr als 60 Stunden lang anhält (vgl. Abb. 9 und 10). Diese Messungen zeigen außerdem noch, daß die verhältnismäßig kurze Verzögerung im Angebot von ^{32}P (Kurve B) den Gesamttransport verringert. Wahrscheinlich beruht dies darauf, daß während der Alterungszeit von 8 Stunden die Blattspitzen ihre Fähigkeit der ^{32}P -Aufnahme vom Lösungstropfen zum Teil verloren haben, denn in der Gruppe A kann das vorher aufgenommene ^{32}P unvermindert mobilisiert werden. Die kleinen Mengen des ^{32}P -Transports bei älteren Blättern (Abb. 10 verglichen mit Abb. 9) könnten sich auch auf diese Weise erklären lassen.

Die Vermutung, daß der Beginn der Mobilisation in der Tat nichtlinear verläuft, wird noch gestützt durch die Beobachtung, daß die Geschwindigkeit des Trans-

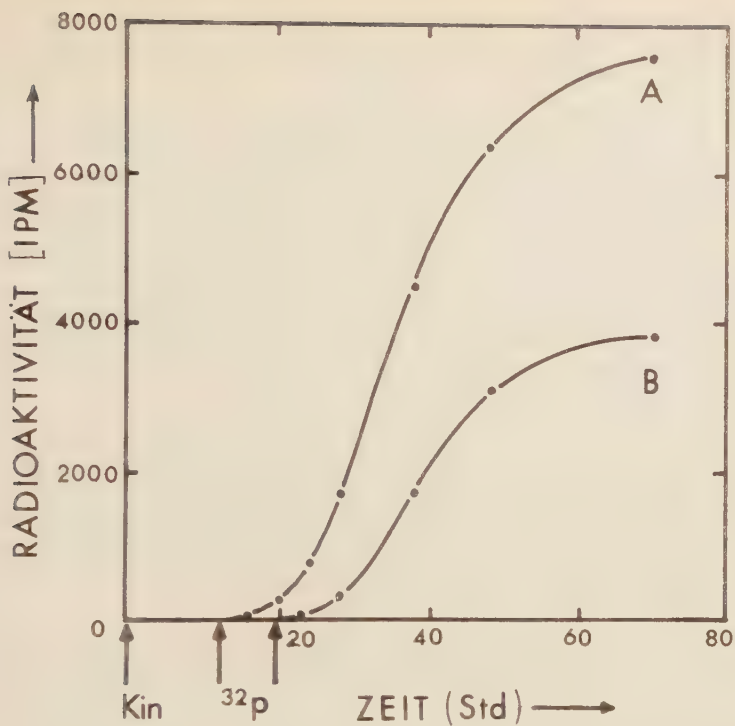


Abbildung 11: ^{32}P -Mobilisation nach Vorbehandlung mit Kinetin

ports sich in dieser Zeit erhöht. (Tabelle IV). Sie wurde wie vorher (Tabelle III) aus Messungen durch Durchlaufzeit errechnet.

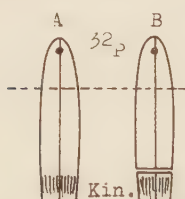
Tabelle IV: Zunahme der Geschwindigkeit des ^{32}P -Transports während der Mobilisation.

Versuch Nr.	Transportgeschwindigkeit (mm/Std.)	
	14 Std. nach Beginn d. Mobilisation	21 Std. nach Beginn d. Mobilisation
1	3.6	7.7
2	1.6	2.5
3	2.5	3.7

c) Der Einfluß von Empfänger- und Lieferbereich auf den Verlauf der Mobilisation

Der gerichtete Transport (Mobilisation) ist die Wechselwirkung zweier verschiedener Gewebezonen, die durch Stoffaufnahme bzw. -abgabe gekennzeichnet sind. Eine Deutung der Zeitkurven muß deshalb berücksichtigen, daß beide Funktionen möglicherweise den Verlauf der Mobilisation bestimmen können.

Allein die Tatsache, daß ein Stofftransport zu einer Kinetinstelle hin gelenkt oder beschleunigt werden kann, beweist, daß der Aufnahmebereich zumindest für den ersten Anstoß der korrelativen Ereignisse verantwortlich ist. Daß aber auch deren weiterer Verlauf von der Aktivität des mobilisierenden Zentrums abhängt, läßt sich auf einfache Weise zeigen:



7 Blattpaare erhielten Kinetin an der Basis. Bei der Gruppe B (vgl. Schema) wurden sie nach 12 Std. abgeschnitten. ^{32}P wurde dann aufgetragen und die Zeit bis zum Eintreffen der Radioaktivität im Zählbereich bestimmt.

In den ersten zehn Stunden nach der Fütterung erreichte das ^{32}P nur dort den Zählbereich, wo das Kinetinzentrum noch vorhanden war (Abb. 12). Dessen Anwesenheit ist also auch nach der ersten Festlegung der Transportrichtung noch notwendig für den Fortgang der Mobilisation. Um den Zusammenhang zwischen Kinetinreaktion und Mobilisation exakter darzustellen, wäre es aber notwendig, den Gesamttransport mit irgendeiner meßbaren Aktivität des Kinetinflecks zu vergleichen, die nicht unmittelbar in den Transportprozeß eingeht, z.B. mit der Akkumulierung von ^{32}P im "Gipfel" der Scannerkurve.

In abgeschnittenen Primärblättern wurde der Verlauf des auf ein Kinetinzentrum zu gerichteten Transports nach der gewöhnlichen Methode (vgl. Abb. 9, 10) gemessen; außerdem wurde zu verschiedenen Zeiten an einem Scanner die Verteilung der Radioaktivität aufgezeichnet. Die Zunahme der Gipfelhöhe wurde als die charakteristische Aktivität des Kinetinflecks mit dem Totaltransport verglichen. Die Meßwerte eines Einzelblattes sind als Beispiel in der Abb. 13 wiedergegeben.

Man sieht, daß die Akkumulationskurve zwei Perioden einer gesteigerten Aktivität durchläuft und daß sich diese Kinetik der Kinetinreaktion auf die des Gesamttransports überträgt. Auf die gleiche Weise kommen wohl auch die kinetinbedingten Änderungen der Mobilisationskurven in Abb. 9 zustande. Andererseits verläuft aber die Transportkurve wiederum nicht streng proportional zur

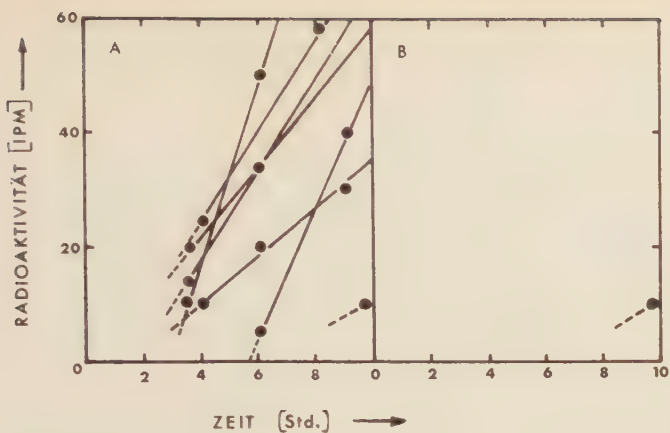


Abbildung 12: Die Abhängigkeit der ^{32}P -Mobilisation von der Anwesenheit des mobilisierenden Zentrums.

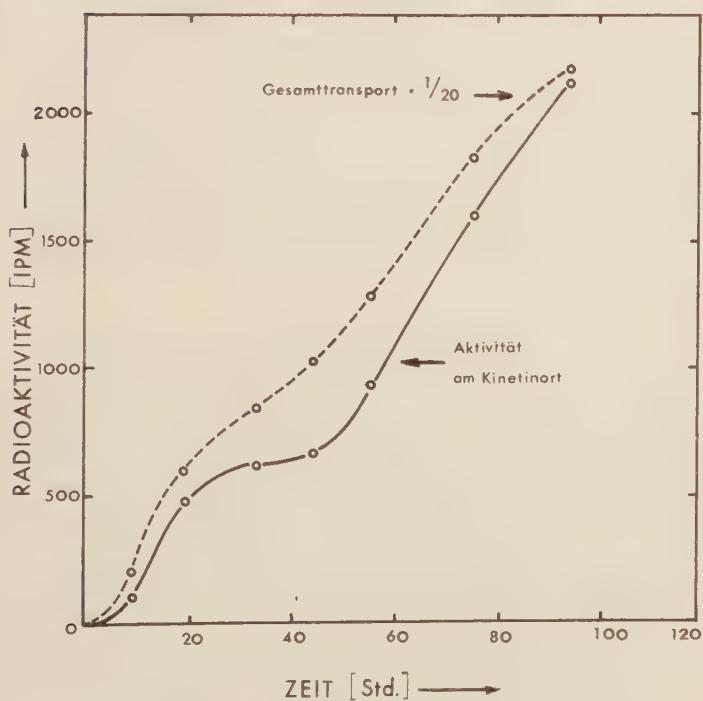


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Akkumulation und Gesamtmobilisation von ^{32}P .

Akkumulationskurve. Das heißt, daß die Vorgänge im Kinetinzentrum sich zwar auf die Gesamtmobilisation auswirken, daß aber die Lieferung von ^{32}P wahrscheinlich nicht völlig von ihnen abhängt.

Während also das mobilisierende Zentrum den Transport induziert und unterhält, bleibt noch die Möglichkeit, daß die Abgabe von ^{32}P die Zeitkurve als begrenzender Faktor beeinflusst. Dies wird jedenfalls in späteren Stadien der Mobilisation eintreffen, wenn die Lieferungsfähigkeit während des Absterbens der abgebenden Gewebe nachläßt. Beginn und Dauer des Absterbens selbst wird nun aber nicht allein von der Intensität der Mobilisierung bestimmt, sondern auch von der Empfindlichkeit mit der der Lieferbereich auf den Entzug von Stoffen reagiert. Zum Beispiel wird der Alterungsprozeß bei den jüngeren Blättern in Abb. 9 viel später beendet als bei den älteren Blättern in Abb. 10, obwohl die festgestellte Transportleistung nicht geringer ist. Kurz zusammengefaßt: Für den anfänglichen Verlauf der Zeitkurve des ^{32}P -Transports ist der Aufnahmebereich verantwortlich. Die wachsende Mobilisationsrate, die einer zunehmenden Transportgeschwindigkeit entspricht (Tabelle IV), bedeutet also eine wachsende Aktivität des mobilisierenden Zentrums. Je nach der Widerstandsfähigkeit des alternden Lieferbereichs wird aber die ^{32}P -Abgabe früher oder später zum begrenzenden Faktor; die Mobilisationsrate nimmt dann ab.

d) Die Interpretation der Transport-Zeitkurve:

Die Mobilisationsrate steigt zuerst annähernd proportional zur transportierten Menge an. Später aber wird sie immer mehr durch die Lieferfähigkeit des abgebenden Bereiches eingeschränkt, wenn dieser sich in zunehmendem Maße entleert. Unter diesen Annahmen würde sich die Kinetik in der Gleichung zusammenfassen lassen:

$$dm/dt = km(N - m),$$

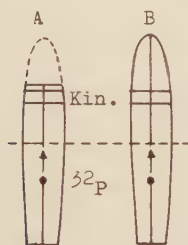
wo m = Menge des mobilisierten Materials, t = Zeit, N = Menge des gesamten mobilisierbaren Materials, k = Konstante. Diese Gleichung beschreibt einen regulären autokatalytischen Prozeß, bei dem die "Sigmoidkurve" der Funktion $m=f(t)$ um $m = N/2$ symmetrisch ist. Bei der Mobilisationskurve dagegen verläuft der Abfall der Rate nicht schnell genug, ist zu lange hinausgedehnt, um zum Modell zu passen. Doch muß auch in Betracht gezogen werden, daß N in der Zeit nicht konstant bleibt: Das Blatt nimmt ständig mehr ^{32}P von außen auf. Außerdem wird "innen" festgelegtes ^{32}P zum Teil wieder beweglich gemacht, wie das folgende Experiment zeigt.

Transport von ^{32}P von Blattspitzen zu basalen Kinetinzentren wurde bei zwei Serien von Primärblättern zu verschiedenen Zeiten mit dem

Zählrohr gemessen. Nach einem Tag wurde bei der einen Gruppe das Liefergewebe abgeschnitten und die Zeitkurve des Transports fortgesetzt (Abb. 14).

Remobilisierung von abgelagertem ^{32}P erfolgt in der zweiten Phase der B-Kurve in Abb. 14. Sie beträgt ungefähr ein Sechstel der gesamten Transportleistung. Die extrapolierte Größe P dürfte den beweglichen ^{32}P -Inhalt des Phloems darstellen. Bei der gegebenen Gesamtmobilisationsrate läßt sich übrigens die Zeit, die notwendig ist, um das Phloem in seiner Länge von 1.5 cm zu leeren, als ca. 2 Std. kalkulieren. Der daraus erhaltene Wert der Transportgeschwindigkeit von 7.5 mm/std. liegt in der Größenordnung der Resultate direkter Messungen (vgl. Tabellen III und IV).

Was die Möglichkeit betrifft, daß die oben beschriebene Kinetik der Mobilisation wirklich auf einer autokatalytischen, selbststimulierten Tätigkeit beruht, so wäre es denkbar, daß die Entwicklung einer "mobilisierenden Kraft" im aufnehmenden Gewebe (mit oder ohne Kinetin) durch die Zufuhr von Material gefördert wird. Der folgende Versuch wurde angesetzt, um die Hypothese durch ein physiologisches Ergebnis zu stützen.



Primärblattpaare wurden nach dem nebenstehenden Schema präpariert. Die Kinetinzentren in Gruppe B hatten die Möglichkeit, Stoffe von der Spitzenregion her zu attrahieren, während in der Gruppe A die Spitzenteile abgeschnitten waren und die Kinetinzentren deshalb ohne solche Zufuhr blieben.

Zuerst wurde nur die Entwicklung der kinetin-induzierten Chlorophyllinseln beobachtet. Sie waren in einigen Tagen in Gruppe B größer als in A (Abb. 15). Bei einem anderen Experiment wurde dann in der gleichen Versuchsanordnung noch die ^{32}P -Mobilisierung aus der Blattmitte heraus in das darüberliegende Kinetinzentrum bei A und B gemessen. Es wurde gefunden, daß in Gegenwart eines Liefergewebes die Kinetinzentren dreimal so viel Radioaktivität ansammelten wie ohne sie (Verhältnis : $3,1 \pm 1,3$). Auch die "grünen Inseln" waren wieder größer (Durchmesser im Durchschnitt 7.8 mm mit, 5.7 mm ohne Liefergewebe). Wenn also eine vermehrte Zufuhr von Stoffen die "mobilisierende Kraft" eines Kinetinzentrums verstärken kann, so dürfte ein solcher Effekt auch mit wachsender Menge akkumulierter Substanzen an einem gegebenen Blatt eintreten.

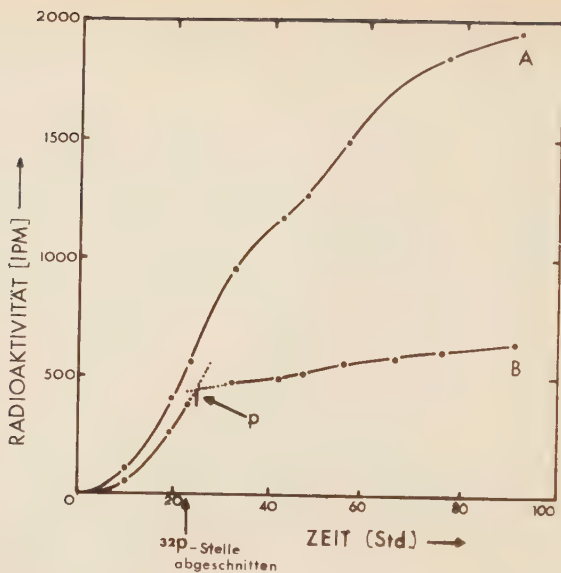


Abbildung 14: Mobilisation von abgelagertem ^{32}P

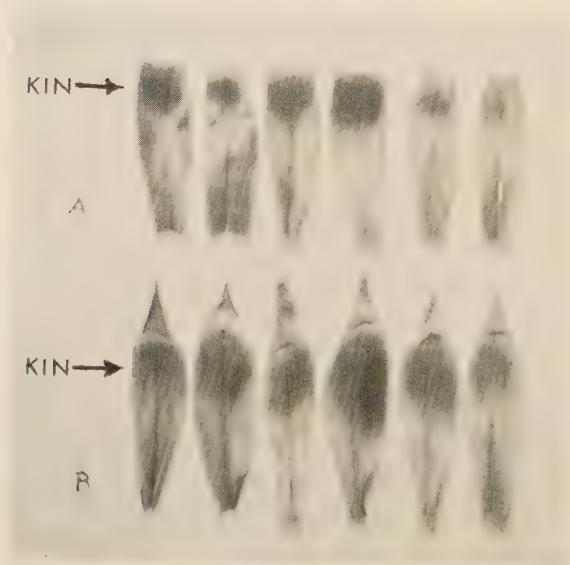


Abbildung 15: Induktion von Chlorophyllinseln mit und ohne Liefergewebe.

B. DER MECHANISMUS DES GERICHTETEN TRANSPORTS

Stoffe können von Zelle zu Zelle diffundieren oder sie können auf längere Entfernung hin mit größerer Geschwindigkeit in spezialisiertem Transportgewebe sich bewegen. Das isolierte Maisblatt transportiert radioaktives Phosphat mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 7 mm/Std. Nach SWANSON (1959) wäre dies noch nicht zu schnell für eine - evtl. "erleichterte" - Diffusion. Wandern doch auch Auxine ähnlich schnell durch Parenchymgewebe ohne die Hilfe der Gefäßbündel (HERTEL, 1962). Es wurde deshalb versucht, den ^{32}P -Transport zuerst zu lokalisieren.

1. Der Weg des ^{32}P -Transports.

Auf autoradiographischen Aufnahmen von ^{32}P -gefütterten Maisblättern war die Radioaktivität hauptsächlich in der Nähe der Leitbündel zu sehen. Das beweist jedoch noch nicht, daß sie sich auch dort bewegte; Sie könnte dort auch nur gespeichert worden sein. Falls aber der Transport wirklich durch die Bündel verlief, dann dürfte er an deren axiale Richtung gebunden sein. Quermobilisation von einer Seite des Blattes zur anderen wäre hier, - im Gegensatz zum Parenchymtransport -, wahrscheinlich schlecht möglich. Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um die Möglichkeit eines Quertransportes von ^{32}P zu untersuchen.

Blätter erhielten ^{32}P und Kinetin wie es im Schema der Abb. 16 angedeutet ist. Nach 18 Stunden Transportzeit wurden sie entlang der Mittelrippe auseinandergetrennt. Die Hälften wurden dann einzeln über den Forro-Scanner gezogen.

Mobilisierung über die Bündel war nicht möglich (Abb. 16/A). B ist die Kontrolle; sie zeigt, daß ein Kinetinzentrum das ^{32}P akkumulieren kann, wenn es mit der Fütterungsstelle in gerader axialer Verbindung steht.

^{32}P wandert also wirklich in einem Längskanal. Wäre dieser das Xylem, dann würde die Radioaktivität dort der Wasserströmung folgen. Es wurde gefunden, daß das ^{32}P auch dann sich ungeändert auf die Blattbasis zu bewegte, wenn das Blatt mit der Basis im Wasser stand, - daß die Wanderung des ^{32}P also vermutlich einer evaporationsbedingten Wasserbewegung entgegenlief. Der ^{32}P -Transport zeigte sich außerdem an die Aktivität lebender Zellen gebunden:

- 1.) Er wurde durch eine in heißem Dampf abgetötete Zone blockiert. Wie Abb. 17 zeigt, unterblieb auch nach zwei Tagen Transportzeit eine Verteilung der Radioaktivität über die Barriere hinaus zur Basis hin. Dabei blieb auch das Chlorophyll im Spitzenabschnitt erhalten, während es unterhalb der getöteten Zone abgebaut wurde.

2.) Ähnliche Transporthemmungen konnten auch durch Behandlung mit Entkopplern der oxydativen Phosphorylierung, durch 2,4-Dinitrophenol ($4 \cdot 10^{-3} \text{M}$) und Carbonylcyanid-phenylhydrazon ($5 \cdot 10^{-5} \text{M}$; HEYTLER und PRICHARD, 1962) erzielt werden. Allerdings ließ sich durch diese Stoffwechselgifte der Transport nur in wenigen experimentellen Fällen ganz aufhalten. Meistens verursachten sie nur - ähnlich einer sehr verdünnten Kinetinlösung - eine geringe Akkumulation von ^{32}P und eine schwache "Chlorophyllinsel" an der behandelten Stelle des Blattes. Der ^{32}P -Transport zu solchen Stellen hin war aber nicht signifikant erhöht.

Dies sind deutliche Anzeichen dafür, daß das ^{32}P nach dem Auftragen auf die Blattoberfläche in das Phloem gelangt und dort weiterwandert. Darin entspricht der Befund einigen anderen bisherigen Berichten (BIDDULPH und MARKLE, 1944; SWANSON und WHITNEY, 1953; BIDDULPH, 1956). Die Erhaltung des Chlorophylls hinter Phloembarrieren deutet darauf hin, daß der Phloemtransport im allgemeinen der Träger der Alterungs-Korrelationen ist.

2. Der Mechanismus des ^{32}P -Transports:

Die Frage, wie ein Kinetinzentrum von einer entfernten Stelle des Blattes her verschiedene Stoffe durch das Phloemsystem anziehen kann, stößt auf das traditionelle Problem des Phloem-Transportmechanismus: Werden die gelösten Substanzen in einem strömenden Medium mitgezogen? (MALPIGHI, 1686; MÜNCH, 1927; BAUER, 1953; ZIEGLER und VIEWEG, 1961). Oder bewegen sich die Moleküle einzeln (SACHS, 1887) durch "aktivierte" Diffusion (MASON und MASEKELL, 1928; MASON und PHILLIS, 1937; CLEMENTS, 1940; SCHUMACHER, 1947) oder "Spreitung an Grenzflächen" (VAN DEN HONERT, 1932) oder durch Diffusion, unterstützt durch Strömungsvorgänge (DE VRIES, 1885; CURTIS, 1935)? Die "mobilisierende Kraft" könnte im Falle des molekularen Transports ein Diffusionspotential sein, vielleicht vom Vorgang der Akkumulation aufrecht-erhalten. Bei der Massenströmung dagegen wäre sie die Zugkraft, die irgendein Pumpmechanismus des mobilisierenden Zentrums auf die Flüssigkeit ausübt. Da in diesem Falle alle im Phloemsaft gelösten Substanzen unabhängig vom Vorgang der Akkumulierung vom Kinetinort attrahiert würden, könnte eine Untersuchung des Transports nichtakkumulierter Stoffe Aufschlüsse geben über das Vorhandensein einer Massenströmung.

a) Kinetin und der Transport von Ionen.

Transportversuche wurden mit verschiedenen markierten Ionen durchgeführt, da bei ihnen erwartet werden konnte, daß sie nicht wie Phosphat in den Stoffwech-

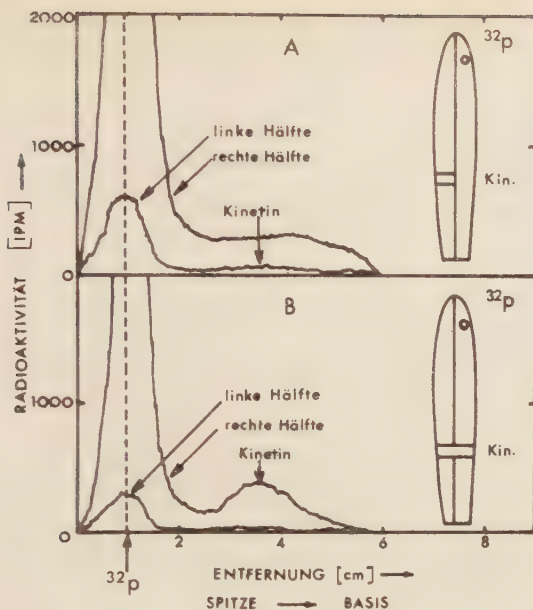


Abbildung 16: Quermobilisation

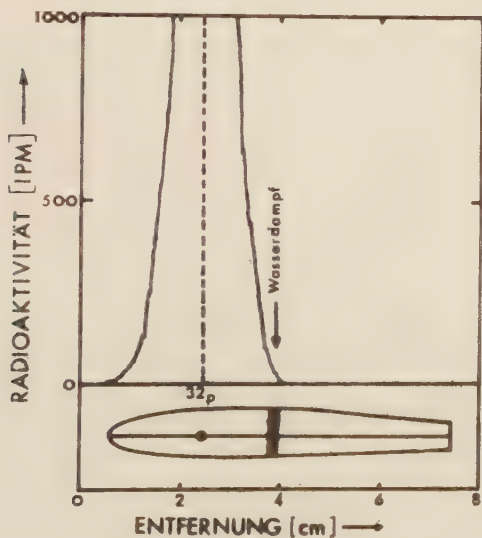


Abbildung 17: Blockierung des ^{32}P -Transports durch heißen Wasserdampf

sel mit einbezogen und deshalb möglicherweise auch nicht akkumuliert würden. Wohl aber könnten sie im Falle einer stimulierten Massenströmung deren Bewegung anzeigen.

Tröpfchen von neutralisierten Lösungen verschiedener radioaktiver Kationen und Anionen ($^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$, $^{131}\text{I}^-$) wurden auf die Blattoberfläche aufpipetiert. Die Blätter wurden nach beliebigen Transportzeiten über den Scanner gezogen.

Die Scannerkurven zeigten keine Andeutung eines "Gipfels" (zwei Beispiele sind in Abb. 18 wiedergegeben). Keines der Ionen wurde also an der Kinetinstelle akkumuliert. ^{22}Na wurde sodann wegen seiner hohen spezifischen Aktivität und der starken Positronenstrahlung für weitere Transportversuche ausgewählt.

Um eine etwaige Stimulierung des Gesamttransports von ^{22}Na durch Kinetin feststellen zu können, wurde $^{22}\text{NaCl}$ -Lösung auf die Spitzen gepaarter Blätter aufgetragen, die in der Mitte zum Teil Kinetin, zum Teil Wasser erhielten. Nach einer Transportzeit von 30 Stunden wurde die hinter eine bestimmte Linie gewanderte Radioaktivität mit einem Durchflußzählrohr gemessen (Tabelle V).

Tabelle V: Förderung des ^{22}Na -Transports durch Kinetin

Anzahl der Blattpaare	Durchschnitt des Gesamttransports (ipm)		Stimulierung des Transports durch Kinetin (% der Kontrolle)
	mit Kinetin	ohne Kinetin	
25	1947	1115	74,6

99 % Sicherheit für Transportstimulierung besteht im Intervall von 19.1 bis 130.0 %.

^{22}Na wird also von dem Kinetinzentrum angezogen, obwohl es nicht akkumuliert wird. Damit ist die Möglichkeit angedeutet, daß auch ^{32}P in einer durch Kinetin beschleunigten Massenströmung, unabhängig vom Akkumulationsvorgang, im Blatt verlagert wird. Ein zwingender Beweis ist es aber keineswegs. Der Kinetineffekt scheint bei ^{22}Na (Tab. V: 74%) auch viel geringer zu sein als bei ^{32}P (Tab. III und Abb. 8 : ca. 300 %), so daß ein verhältnismäßig schneller molekularer Transport von ^{32}P eine langsamere Massenströmung eventuell überlagern könnte. Es ist deshalb notwendig, im ^{32}P -Transport selbst ein Kriterium zu finden, das eine Unterscheidung der beiden Modelle gestattet. Eine kritische Fragestellung ist zum Beispiel die des "bidirektionalen Transports"

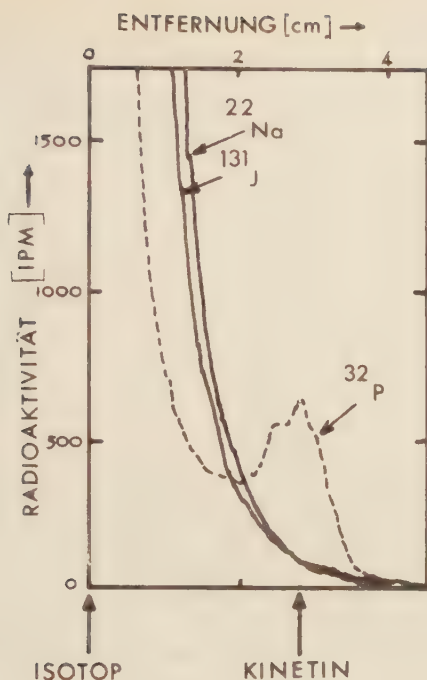


Abbildung 18: Einfluß des Kinetins auf die Verteilung Ionen.

(CHEN, 1951; BIDDULPH und CORY, 1960). Sie soll im Folgenden behandelt werden.

b) Konkurrenz zweier Mobilisationszentren

In einem Massenströmungssystem kann die Mobilisation nicht gleichzeitig in entgegengesetzter Richtung verlaufen, da einander gegenüberstehende Zentren miteinander um das fließbandartige Transportsystem konkurrieren. Für den Fall einer molekularen Bewegung dagegen bestünde keine Schwierigkeit, einander gegenüberstehende Zentren zur selben Zeit von der Mitte aus zu beliefern ("bidirektionaler Transport").

Ein Beispiel zweier entgegengesetzter Mobilisationszentren ist schon bei einem Blatt gegeben, das einen Kinetinfleck trägt. Das induzierte Zentrum steht hier dem natürlichen, der Basis, gegenüber. Wenn nun auf beiden Seiten des Kinetins in gleichen Abständen ^{32}P gefüttert und das Blatt nach einiger Zeit über

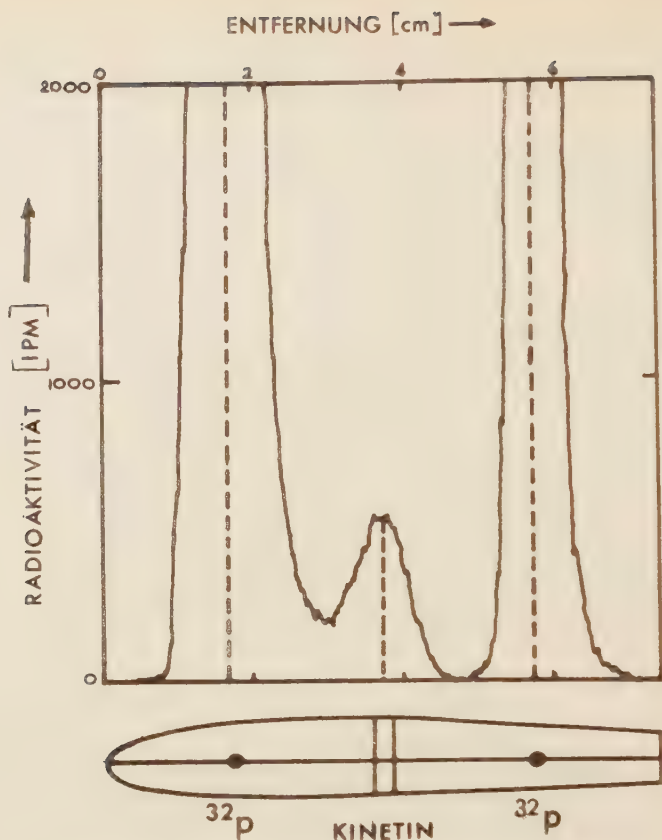
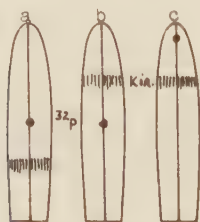


Abbildung 19: "Polarität" der ^{32}P -Mobilisation im Blatt

den Scanner gezogen wird, so sieht man, daß die Verteilungskurve der basalen ^{32}P -Quelle das Zentrum nicht erreicht (Abb. 19). Dessen Anziehungskraft wirkt stärker auf die Spitzenregion. Da aber diese "Polarität" des Blattes auch nur auf unterschiedlicher Ergiebigkeit der ^{32}P -Quellen beruhen könnte, wurden nicht nur der Ort der Kinetinbehandlung, sondern auch die ^{32}P -Zufuhrstelle im nächsten Experiment konstant gehalten.



Acht Dreiergruppen von Primärblättern wurden nach dem nebenstehenden Schema mit Kinetin und ^{32}P versehen. Die in den Kinetinzentren befindliche Gesamtmenge von ^{32}P wurde 30 Stunden später mit dem GM-Zählrohr festgestellt. Tabelle VI enthält die einzelnen Meßwerte.

Tabelle VI: Kinetin-induzierter ^{32}P -Transport gegen die Richtung des natürlichen Gradienten des Blattes.

Triplet	^{32}P in den Kinetinzentren (ipm)		
Nr.	a	b	c
1	318	15	4300
2	354	19	440
3	5850	12	2342
4	1388	18	301
5	5280	52	412
6	340	77	1203
7	3927	816	2027
8	2740	60	957

Das Kinetinzentrum in b attrahiert fast gar kein ^{32}P von einem Bereich, der andererseits genug an die Basis liefert (a). Daß das Fehlen des gerichteten Transports in b nicht nur (wie GUNNING und BARKLEY, 1963, vermuteten) auf die evtl. geringere Reaktionsfähigkeit der Spitzenregion zurückzuführen ist, geht aus der Versuchsanordnung c hervor. Die Polarität liegt also im Transportsystem. Sie ist aber nicht unabänderlich in der Konstruktion des Phloems festgelegt, denn die Richtung des Transports kann unter Umständen umgekehrt werden: Gewöhnlich wurde bei Versuchsbedingungen des obigen Experiments (b) in 10 bis 20 % der Blätter eine Mobilisation zur Spitze hin gefunden. Die einfachste Erklärung dafür bietet die Annahme, daß das Kinetinzentrum mit der Basis um einen Massenströmungstransport konkurriert, dessen Richtung und Größe sich nach dem Verhältnis der mobilisierenden Kräfte richtet. Die Hemmung, die nach dieser Vorstellung die beiden Zentren aufeinander ausüben, sollte als quantitativer Ausdruck des Konkurrenzverhältnisses in einem Versuch bestimmt werden (Tabelle VII).

Gepaarte Blätter erhielten ^{32}P in der Mitte. Bei der einen Gruppe wurden außerdem noch Kinetinzentren im oberen Drittel der Blätter induziert. Die Menge des zur Basis und in Richtung Spitze transportierten ^{32}P wurde in bestimmten Abständen vom Tropfen (gestrichelte Linien im Schema) nach einem Tag gezählt.

Nach Tabelle VII hemmt eine Kinetinbehandlung der Blattspitze nicht nur die Verlagerung der Radioaktivität zur Blattbasis (Verhältnis Basis/Spitze = 1,8 statt 30,3), sondern verringert auch die Gesamtmenge des abtransportierten Materials (ca. 54 % der Kontrolle); sie bremst also den Transport überhaupt.

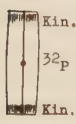
Tabelle VII: Die kompetitive Hemmung der Basis-Mobilisation durch Kinetinzentren.

Behandlung	Durchschnittl. Mobilisation (ipm)			Spitze + Basis
	zur Spitze	zur Basis	Basis/Spitze	
	65	1982	30.3	2047
	392	694 (= 34.8 ± 9.3 % d. Kontr.)	1.8	1086 (= 54.2 ± 8.1 % d. Kontr.)

In wenigen einzelnen Blättern wird dabei die Richtung des Transports ganz umgekehrt. Ob aber die Mobilisation in manchen Fällen auch gleichzeitig in entgegengesetzter Richtung verlaufen kann, ist in einem solchen Versuch schwer zu beurteilen, da sich gewöhnlich an der Basis kein deutlicher Scanner-Gipfel ausbildet. Aus diesem Grunde wurden nun auch zwei Kinetinzentren einander gegenübergestellt.

Kinetin wurde bei 3.5 cm langen Blattstücken (vgl. Schema in Tabelle VIII) am oberen Ende (a) oder an beiden Enden (b) aufgetragen. ³²P wurde in der Mitte aufpipettiert. Zwanzig Stunden später wurden Scannerkurven angefertigt und qualitativ nach dem Erscheinen von "Gipfeln" ausgewertet.

Tabelle VIII: Konkurrenz zweier Kinetinzentren.

Behandlung	Anzahl der Blattpaare	an Spitze allein	Anzahl der "Gipfel" an Basis allein	an beiden Enden zu- gleich
a 	7	7	0	0
b 	21	5	13	(3)

In diesem Experiment war das Kinetinzentrum in "a" völlig dominant über die Blattbasis, wahrscheinlich wegen der Kürze der Blattabschnitte. Wenn aber die Konkurrenzkraft der Basis mit Kinetin verstärkt wurde (b), so zeigten 13 von 21 Blättern einen absolut einseitigen Transport zur Basis, fünf einen einseitigen Transport zum oberen Zentrum, und nur drei hatten ^{32}P an beiden Enden zugleich. Aber auch bei diesen "bidirektional" mobilisierenden Blättern war die Aktivität an der Spitze nicht als ein deutlicher "Gipfel" der Scannerkurve ausgeprägt. Etwas ^{32}P bewegt sich wahrscheinlich stets gegen die Hauptrichtung des Transports; es ist nicht bekannt, auf welche Weise dies geschieht. Doch eine zweifelsfreie "bidirektionale" Mobilisation wurde nicht gefunden. So wird also der Transport zwischen zwei gegenüberstehenden Attraktionszentren nicht nur in seinem Ausmaß, sondern auch in seiner Richtung völlig von der Differenz der Kräfte bestimmt, wie es die Massenstromhypothese verlangt.

Da das korrelative Altern auf dem Phloemtransport beruht (vgl. S.32), drückt sich die Konkurrenz zweier Kinetinzentren sehr anschaulich auch im Verlauf des Chlorophyllabbaus aus.

Viergruppen von Primärblättern wurden behandelt, wie es in Abb. 20 ersichtlich ist: A: Kinetin an der Basis; B: Kinetin an Basis und oberer Blatthälfte (weiße Markierung); C: Wie B, doch Kinetinzentren durch einen Schnitt getrennt; D: Blatt in der Mitte auseinandergeschnitten, ohne Kinetin. Nach 50 Std. Alterungszeit wurden typische Vertreter jeder Gruppe photographiert (Abb. 20)



Abbildung 20: Konkurrenz zwischen zwei Kinetinzentren

In B besitzt die Blattmitte etwas mehr Chlorophyll als in A, weil das Kinetinzentrum in der Spitzenhälfte des Blattes das korrelative Altern der Blattmitte durch die Basis etwas bremst. Die mobilisierenden Kräfte der beiden Zentren, die sich hier anscheinend die Waage halten, kommen aber zur Wirkung, wenn man das Blatt in der Mitte durchschneidet (C). Daß die in der Blattmitte einsetzende Vergilbung nicht nur ein Schnitteffekt ist, geht aus D hervor.

c) Erklärung der Verteilungskurve des transportierten ^{32}P durch ein Transportmodell.

Während der Mobilisation wird verhältnismäßig viel markiertes Material schon auf dem Wege zwischen Liefer- und Empfängerbereich abgelagert. Seine mengenmäßige Verteilung, welche bei den Maisblättern in den Scannerkurven dargestellt wurde, steht nun aber in Beziehung mit der Transportkinetik. Diese Zusammenhänge sind aufgrund von Messungen ähnlicher Radioaktivitätsprofile (z. B. VERNON und ARONOFF, 1952; SWANSON und WHITNEY, 1953; BIDDULPH und CORY, 1957) schon mehrmals diskutiert worden (HORWITZ, 1958; CANNY, 1961; SPANNER und PREBBLE, 1962; EVANS et al., 1963). Da eine Analyse der Maisblatt-Scannerkurven einige Anhaltspunkte zum Verständnis des Transportmechanismus geben könnte, wurden sie im Folgenden anhand eines Massenstrom-Modells von HORWITZ (1958) etwas genauer untersucht.

Der Ansatz zur Deutung der Verteilungskurven ist die Annahme, daß gelöste Stoffe aus der beweglichen Phase des Phloems proportional ihrer Konzentration in eine angrenzende immobile Phase übertragen werden. Die weitere Interpretation der Kurven wird sehr vereinfacht, wenn dieser Verlust der markierten Substanzen aus dem Transportsystem als irreversibel gelten kann. Daher wurde zunächst die Beweglichkeit von abgelagertem ^{32}P -Phosphat in einem Experiment untersucht, bei dem die ^{32}P -Lieferstelle nach einem Tag Transportzeit abgeschnitten und die nachfolgende Veränderung der Scannerkurven festgestellt wurde. 33 Stunden nach Abschneiden war die Menge der fixierten Radioaktivität im Lieferbereich nur um etwa 20 % gesunken. Für Kurzzeiteperimente kann also die Ablagerung von ^{32}P entlang der Transportstrecke als irreversibel gelten.

Strömt eine Flüssigkeit mit der Geschwindigkeit v durch die Siebröhren (Querschnittsfläche A), und wird der gelöste Stoff (Konzentration C) irreversibel an die unbewegliche Phase gebunden, dann gilt für die Abnahme der Stoffkonzentration mit wachsender Entfernung (x) vom Anfangspunkt des Transports:

$$dC/dx = -k C/A v \text{ oder } C = C_0 \cdot e^{-kC/A v} \quad (k \text{ ist die "Transfer-Konstante", } C_0$$

die ursprüngliche Konzentration am Anfangspunkt des Transports). Nach HORWITZ (1958) ist dann die Gesamtmenge des gelösten Stoffes (S) zu einer Zeit t in der Entfernung x die Summe von Röhreninhalt: $S_1 = A \cdot C$ und irreversiblen Gesamtverlust: $S_2 = k \cdot C (t - x/v)$, nämlich

$$S = C_0 \cdot e^{-kx/Av} (A + kt - kx/v).$$

Trägt man $\log S$ gegen x auf, so ergibt sich eine Gerade mit der Steigung $-k/Av$; S ist bei Anwendung von Isotopen die Menge der Radioaktivität bei x .

Die Verteilungskurven sämtlicher hier benützter Isotopen wurden nach dieser Methode ausgewertet, indem der Logarithmus der Radioaktivität gegen die Entfernung aufgetragen wurde. Es stellte sich dabei heraus, daß die Kurvenbilder der verschiedenen Kationen und Anionen tatsächlich fast linear waren, also dem Modell angenähert entsprachen (Abb. 21). ^{32}P verhielt sich jedoch anders (Abb. 22; vier gleichbehandelte Blätter zeigen die Streuung). Es sieht aus, als ob hier die Transfer-Konstante erst abnehmen und näher an der Basis wieder etwas zunehmen würde; denn Änderungen der Geschwindigkeit oder des Transportquerschnitts dürften von vornherein als Ursachen ausscheiden, da ja dann auch die Kurven der Ionen mit beeinflußt sein sollten. Man muß jedoch noch mit einer anderen Möglichkeit rechnen: Im Gegensatz zu den anderen Ionen ist das Phosphat ein bedeutender natürlicher Bestandteil der Zellen, der auch sehr intensiv in den Stoffwechsel einbezogen wird. Es kommt in ziemlich großen Mengen im Phloemsaft vor (ZIEGLER, 1956), und man kann annehmen, daß Phosphate nicht nur an der Stelle der ^{32}P -Fütterung in das Phloem geladen werden, sondern am ganzen Strang entlang. Die Folge ist eine während des Transports zunehmende Verdünnung, eine Verringerung der spezifischen Aktivität und damit auch ein scheinbares Abnehmen der Transfer-Konstanten k . Der anfängliche, konkave Teil der logarithmischen Verteilungskurve ließe sich also auf diese Weise erklären. Dann müßte aber eine gegebene Steigung an der Stelle x nicht ein für diesen Gewebebereich charakteristischer Wert sein (bestimmt nur durch k , v und A), sondern sie müßte auch von der Entfernung der ^{32}P -Quelle von x abhängen.

Gepaarte Blattserien wurden mit Tusche an einer Stelle x gezeichnet. (vgl. Schema zu Tabelle IX). Die Gruppe "b" erhielt ^{32}P in 0.8 cm Entfernung von x (in Richtung Spitze), die Gruppe "a" ^{32}P in 2.4 cm und eine zweite Tuschmarke (y) in 1.6 cm Entfernung von x . x war also in der Gruppe b genauso weit von der ^{32}P -Quelle entfernt wie y in Gruppe A.

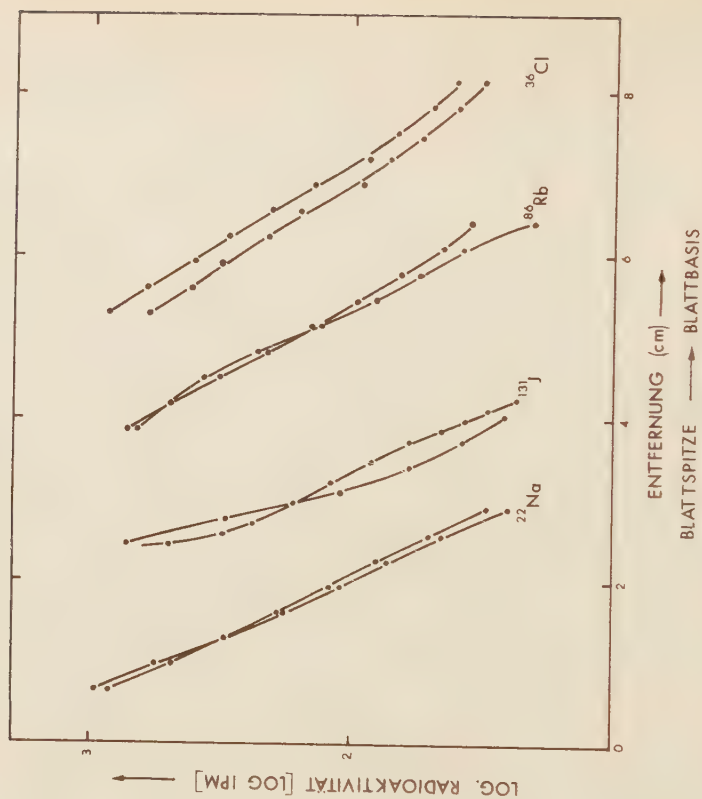


Abbildung 21: Logarithmische Verteilungskurven von Ionen.

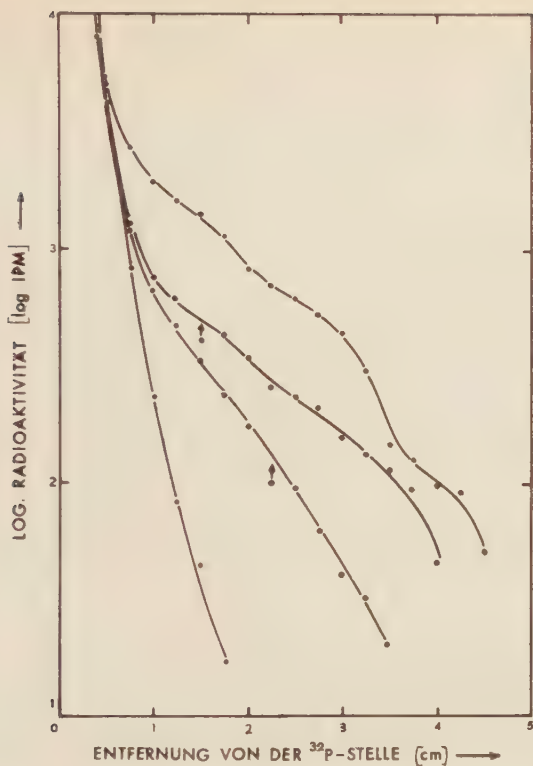
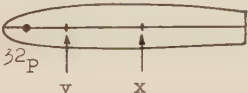
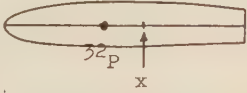


Abbildung 22: Logarithmische Verteilungskurven von ^{32}P .

Tabelle IX: Abhängigkeit der Steigung der logarithmischen Verteilungskurve von ^{32}P von der Entfernung der Applikationsstelle.

Blattpaar Nr.	a		b
	negative Steigung bei:		negative Steigung bei:
	y	x	x
1	5.5	1.2	3.9
2	5.7	3.6	5.7
3	4.7	2.0	3.8
4	6.6	1.4	5.3
5	6.1	0.8	6.5

Die mit der Entfernung abnehmende negative Steigung der logarithmischen Verteilungskurve von ^{32}P (vgl. x mit y in Gruppe a) war in der Tat steiler bei x, wenn das radioaktive Phosphat auf kurze Entfernung an die Meßstelle x herangerückt wurde (Gruppe b), vermutlich eben, weil die während des Transports abnehmende spezifische Aktivität sich wieder erhöht hatte. Was aber nun die wahre Transfer-Konstante k betrifft, so kann man nur sagen, daß sie auf die Basis zu wahrscheinlich ansteigt. Dies ist möglicherweise die natürliche Parallele zu der auffälligeren kinetin-induzierten Akkumulation.

Was auch immer die exakte Auslegung der Verteilungskurven in ihren Einzelheiten wäre, das Transportmodell kann doch im allgemeinen getestet werden. Eine Kinetinbehandlung verursacht eine definierte Veränderung des Systems: Es beschleunigt den Transport. Das Modell der Massenströmung sagt für diesen Fall eine Abnahme der negativen Steigung der logarithmischen Verteilungskurve voraus, das Modell des molekularen Diffusionstransportes dagegen eine Zunahme: denn als Ursache der Beschleunigung käme hier nur ein steilerer Konzentrationsgradient in Frage, der sich dann wieder auf die Verteilungskurven auswirken sollte. Der Einfluß des Kinetins auf die Kurvensteigung wurde im folgenden Experiment untersucht.

Blätter erhielten Kinetin oder Wasser in der Mitte. Nach 24 Stunden wurde ^{32}P bzw. ^{22}Na aufgetragen. Nach weiteren 10 Stunden Transportzeit wurden die Blätter über den Scanner gezogen und die Steigungen der Verteilungskurven zwischen 0,5 cm und 1,0 cm vom Applikationspunkt auf logarithmischem Papier ermittelt (Tabelle X).

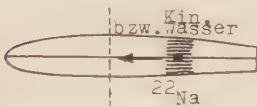
Tabelle X: Der Einfluß kinetin-induzierter Mobilisation auf die Steigung der logarithmischen Verteilungskurve von ^{32}P .

Isotop	Anzahl der Blattpaare	Verhältnis: Steigung ohne Kin. / Steigung mit Kin.
^{22}Na	10	1.31 ± 0.14
^{32}P	12	1.23 ± 0.05

Wo der Transport beschleunigt war, dort verlief die Kurve also flacher, die negative Steigung war geringer. Dieses Ergebnis entspricht der Voraussage des Massenströmungsmodells. Das Verhältnis der Steigungen bei kinetin-behandelten und unbehandelten Blättern deutet dabei auf eine Erhöhung der Transportgeschwindigkeit von ^{22}Na und ^{32}P auf das 1,2- bis 1,3-Fache, was ungefähr mit dem vorher erhaltenen Resultat übereinstimmt (vgl. Tabelle III).

3. Die "mobilisierende Kraft."

Die wahrscheinlichste Ursache einer Kraft, die Wasser- oder Saftströme in Pflanzen in Bewegung setzen kann, ist ein Gradient des osmotischen Potentials. Hier ist die Frage gestellt, wie und wo ein solcher Gradient zur Wirkung kommen könnte. MÜNCH (1927) schlug für den Phloemtransport den Mechanismus einer Druckpumpe vor. Der Phloemsaft sollte im Lieferbereich ein höheres osmotisches Potential besitzen als im empfangenden Teil, so daß Wasser vom Xylem dort schneller eingesaugt und dadurch der Saft zu den aufnehmenden Organen gedrückt würde. Diese würden die gelösten Substanzen aufnehmen, den osmotischen Gradienten also metabolisch erhalten; der übrige Saft mit dem nun niedrigen osmotischen Wert könnte in das Xylem übertreten und den Kreislauf schließen. Wenn Kinetin nun eine solche Zirkulation in Blättern beschleunigen würde, dann müßte der Transport von Ionen im Xylem (denn vermutlich dringen sie auch in das Xylem ein) von Kinetinzentren weg in Richtung Blattspitze stimuliert sein (vgl. nebenstehendes Schema)



Ein solcher Effekt konnte jedoch bei ^{22}Na als Indikator des Transports nicht entdeckt werden.

Ein zweiter Mechanismus wäre einfacher: Der höhere osmotische Wert könnte sich in den Zellen der aufnehmenden Organe befinden. Diese würden dann durch Sog den Saftstrom auf sich zu ziehen (vgl. PRINGSHEIM, 1906; FERNALD, 1925). Allerdings müßte der Flüssigkeitsüberschuß in den Zellen bleiben (Kinetin verursacht Volumenvergrößerung von Blattzellen; KURAISHI und OKUMURA, 1956; MOTHES, 1961); denn eine Zirkulation ist in diesem System schlecht vorstellbar. Unter der Annahme, daß Änderungen der äußeren Wasserzufuhr, zum Beispiel der Evaporationsbedingungen, auch den zellinneren osmotischen Zustand beeinflussen können, wurde versucht, den hypothetischen osmotischen Gradienten zu verändern: Die Differenz des zur Blattbasis hin abfallenden osmotischen Potentials sollte durch verstärkte Verdunstung an der Blattspitze verringert und die Mobilisation dadurch gehemmt werden.

Blattstücke (2,5 cm lang) wurden verschiedenen Feuchtigkeitsbedingungen ausgesetzt. A: Blätter in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre; B: Basales Ende in Wasser, oberes Ende in Luft; C: Blattstücke auf Wasser schwimmend. Nach 2 Tagen wurden die Blätter in 4 Stücke geschnitten und mit heißem Alkohol (80%) extrahiert. Das Chlorophyll wurde spektrophotometrisch bestimmt und der Gesamtgehalt der Blattstücke miteinander verglichen (Abb. 23).

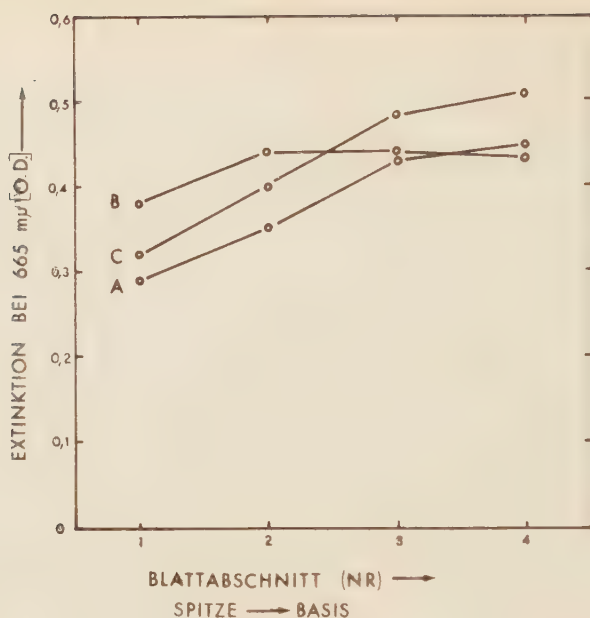


Abbildung 23: Korrelatives Altern unter verschiedenen Feuchtigkeitsbedingungen.

Die Blätter in der Gruppe A bauten das Chlorophyll wie gewöhnlich von der Spitze zur Basis hin ab. In der Gruppe B war jedoch das korrelative Altern gehemmt. Durch die Zufuhr von Wasser zu den Blattbasen waren zwar auch die oberen Blatteile wahrscheinlich besser mit Wasser versorgt worden (durchschnittliches Frischgewicht der Spitzenabschnitte in A: 46 mg. in B: 56 mg); die Probe C zeigt jedoch, daß der erhöhte Wasservorrat allein nur den Chlorophyllgehalt im ganzen Blatt etwas besser konserviert, nicht aber den polaren Verlauf des Alterns ändert: Obwohl die oberen Abschnitte der schwimmenden Blätter (C) mit dem durchschnittlichen Frischgewicht von 62 mg wohl das meiste Wasser enthielten, alternen sie schneller als die Spitzenregion in B. Ausschlaggebend für die Hemmung der Mobilisation ist also tatsächlich der Feuchtigkeitsgradient. Ohne die Annahme unbekannter Nebenwirkungen ließe sich dieser Effekt durch ein Druckstrommodell nicht erklären, da in diesem Fall der Transport durch ein erhöhtes osmotisches Potential der oberen Blattregion bei genügender Wasserversorgung eher beschleunigt als gebremst werden sollte. Die beobachtete Hemmung der Mobilisation würde dagegen ohne weiteres in das Konzept einer Saugpumpe hineinpassen.

C. AKKUMULIERUNG VON ^{32}P AM KINETINORT UND PHOSPHAT-STOFFWECHSEL

1. Charakteristik der ^{32}P -Akkumulierung:

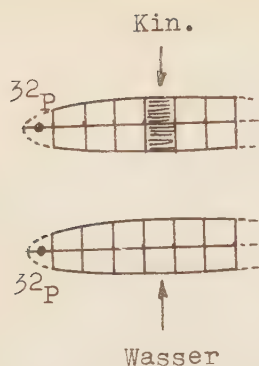
Nach dem oben besprochenen Modell einer Saugpumpenfunktion des Kinetinorts wäre es denkbar, daß die auffällige Anreicherung von ^{32}P an der Kinetinstelle einfach darauf beruht, daß dort der Phloemsaft mit den gelösten radioaktiven Phosphaten gespeichert wird. Es wäre andererseits aber auch möglich, daß das transportierte ^{32}P dort selektiv-metabolisch aus dem Saftstrom in das Gewebe übertragen wird, etwa durch eine kinetinbeschleunigte Reaktion des Phosphatstoffwechsels. Für diese zweite Alternative spricht die Tatsache, daß die verschiedenen markierten Kationen und Anionen nicht merklich akkumuliert werden (Abb. 18), obwohl sie vermutlich auch zum Teil mit dem ^{32}P im Phloem wandern. Da diese Annahme noch einer experimentellen Bestätigung bedarf, wurde der folgende Versuch angesetzt.

Ein Tropfen einer ^{22}Na -Lösung wurde auf das Primärblatt einer intakten Maispflanze aufpipettiert, die zur geringeren Verdunstung in feuchtigkeitsgesättigter Luft gehalten wurde. Unterhalb des Tropfens, jedoch getrennt von ihm durch ein Stück Zelluloid, wurden Maisblattläuse (*Rhopalosiphum maidis*) zur Fütterung aufgesetzt (vgl. KENNEDY und MITTLER, 1953). Nach 20 Stunden wurden die Insekten eingesammelt und die von ihnen aufgenommene Radioaktivität direkt gezählt.

Die Aphiden waren radioaktiv. Diese Insekten stechen spezifisch die Siebröhren an (ZIMMERMANN, 1961); ^{22}Na wird also auch zum Teil wenigstens mit dem ^{32}P im Phloem transportiert.

Da das ^{32}P -Phosphat während des Transports und auch nach dem Übertritt ins Parenchym in vielfältige Reaktionen des Stoffwechsels einbezogen wird, kann man erwarten, daß es im Gewebe nicht als eine einzige bestimmte Form vorliegt, sondern über ein ganzes Spektrum phosphorylierter Substanzen verteilt ist. Einige verschiedene Phosphatfraktionen wurden im folgenden Experiment auf ihren ^{32}P -Gehalt hin untersucht und Kinetinzentren mit unbehandelten Stellen in der Verteilung der ^{32}P -Aktivität verglichen.

Bei fünf Blattpaaren erhielt das eine Blatt in der Mitte jeweils Kinetin (30 mg/ml), das andere Wasser; ^{32}P wurde an den Blattspitzen aufgesetzt (vgl. Schema auf Seite 48).



Nach 20 Stunden wurden die Blätter in je sechs Stücke geschnitten und das Gewebe extrahiert. Es wurde nur die Radioaktivität in der säurelöslichen und -unlöslichen Fraktion gezählt. Für die Kinetinzentren und die entsprechenden wasserbehandelten Kontrollabschnitte wurden Chromatogramme angefertigt, um die säurelöslichen Phosphate zu trennen. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt (A: Markierung der säurelöslichen Fraktion in Kinetinzentren und Kontrollabschnitten, B und C: ^{32}P im Unlöslichen).

Die Markierung der säurelöslichen Fraktion des Kinetinzentrums war gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert (Abb. 24 A); doch gelangte in dem kinetinbehandelten Gewebe fast die doppelte Menge von ^{32}P in die unlöslichen Phosphate (im Verhältnis zur Gesamtaufnahme; Abb. 24/B und C). Diese Fraktion, bestehend aus Nucleinsäuren, Lipiden und Phosphoproteinen, mag mit 10 bis 20% der Gesamtaktivität mengenmäßig für die Akkumulation von ^{32}P zwar wenig bedeuten, doch wird sie am deutlichsten von Kinetin beeinflusst und könnte indirekt für den Vorgang verantwortlich sein.

2. Phosphat Spiegel und Einbau von transportiertem ^{32}P in verschiedene Fraktionen

Die Markierung der Phosphatfraktionen steht grundsätzlich im Zusammenhang mit der akkumulierenden Reaktion und dem Phosphatstoffwechsel, doch ist sie das Endprodukt eines sehr komplexen Vorgangs. Um sie richtig zu deuten, mußte man wissen, in welcher chemischen Spezies das ^{32}P transportiert wird, wie es von der Umgebung des Phloems aufgenommen wird und wie es schließlich im Stoffwechsel durch die Fraktionen läuft. Es bestand jedoch die Möglichkeit, daß eine etwas eingehendere Untersuchung der ^{32}P -Verteilung und der Phosphat Spiegel einige Rückschlüsse auf den Phosphatstoffwechsel und das Wesen der ^{32}P -Akkumulation gestatten würde.

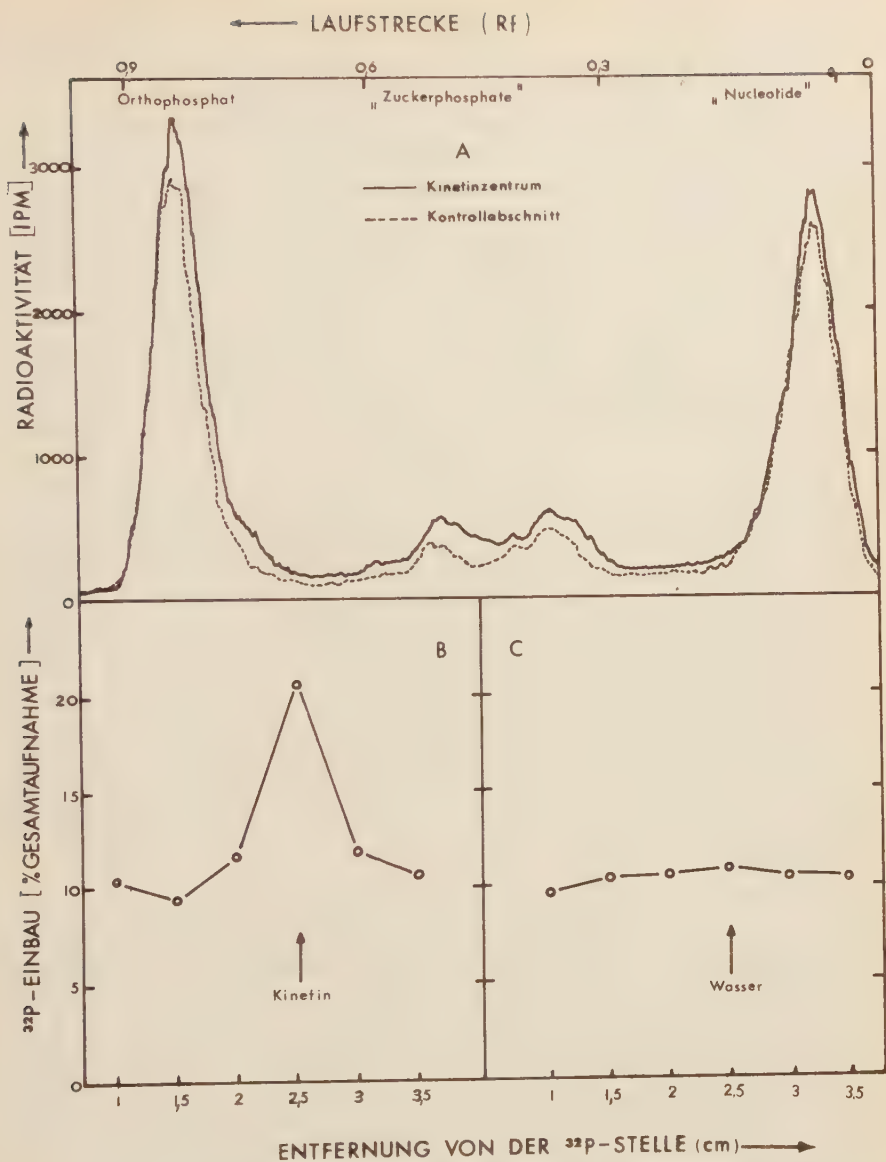
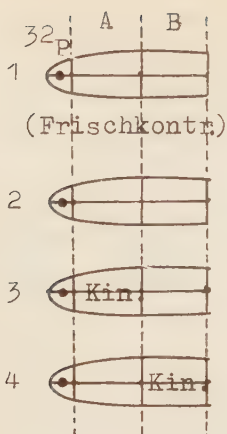


Abbildung 24: Verteilung von ^{32}P in Fraktionen von Kinetinzentren und unbehandeltem Gewebe.



Vier vergleichbare Gruppen von je zehn Primärblättern dreizehn Tage alter Maispflanzen wurden nach dem nebenstehenden Schema für den Versuch präpariert. Kinetin wurde zwischen Tuschemarken mit Filterpapier festgehalten und radioaktives Phosphat mit einer Mikropipette kurz unterhalb der Spitze aufgetragen. Die Blätter wurden in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre unter schwacher Belichtung 30 Stunden lang aufbewahrt. Dann wurden sie in die Abschnitte A und B zerteilt, extrahiert und die Phosphate analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 25, 26, 27 und 28 dargestellt. Die Länge der senkrechten Striche bedeutet die Größe des doppelten mittleren Fehlers.

Abbildung 25 zeigt die Änderungen der Phosphatspiegel während des korrelativen Alterns in einer Übersicht. Ursprünglich (Abb. 25/1) enthielt der Abschnitt A mehr Gesamtphosphat (ca. 1.7 mg/g Frischgewicht) als der basale Teil (ca. 1.6 mg/g Frischgewicht). Nach dreißig Stunden Mobilisation waren etwa 75 μg Phosphat zur Basis hin verlagert (2). Diese Verschiebung war etwas gehemmt (nur 56 μg Phosphat), wenn der Spitzenbereich mit Kinetin behandelt worden war (3); sie wurde dagegen gefördert (150 μg Phosphat), wenn die Blattbasis Kinetin erhalten hatte (4). Der Kinetineffekt besteht also in einer Retention von Phosphaten oder einer Stimulierung der Mobilisation je nach der Stellung des Kinetinzentrums im natürlichen Korrelationssystem. Phosphatmobilisation entspricht darin ganz der Verlagerung stickstoffhaltiger Substanzen (MOTHES et al., 1959).

Vergleicht man die Änderungen der säurelöslichen, alkalilöslichen und alkohol/äther-löslichen Fraktionen während des Alterns (1, 2), so sieht man, daß der abgebende Bereich besonders das säurelösliche, kleinmolekulare Phosphat verliert. Die Basis auf der anderen Seite gewinnt es; doch sie synthetisiert auch etwas Proteidphosphat (=alkalilösl. Phosphat). Die Lipide werden nur wenig verändert und dann in einer Weise, die nicht in das Schema der Mobilisierung paßt.

Was die Wirkung des Kinetins betrifft, so scheint es primär nicht in den gerichteten Transport der säurelöslichen Phosphate einzugreifen (vgl. 3 A mit 2 A und 4 B mit 2 B), sondern in die Synthese der Proteidphosphate, da diese in der Blattbasis durch Kinetin ohne entsprechende Anhäufung löslicher Phosphate um ca. 40% der Kontrolle vermehrt wurden (4B); außerdem verhindert es ja auch den Abbau von unlöslichen Phosphaten und von Chlorophyll in der Spitzenhälfte oh-

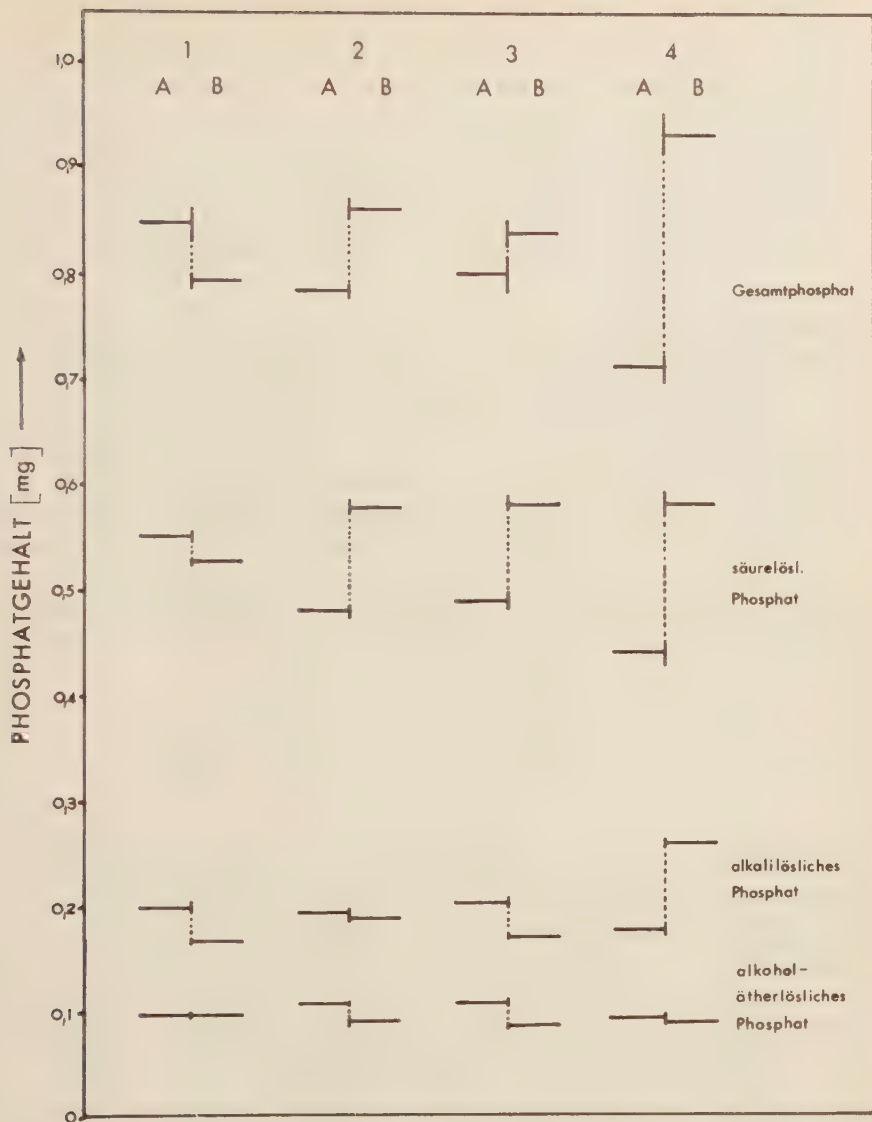


Abbildung 25: Änderungen der Phosphatspiegel während des korrelativen Alterns (Übersicht).

ne nennenswerte Retention der beweglichen löslichen Phosphate (3A).

Abbildung 26 stellt die Analyse der alkalilöslichen Fraktion dar (DNS, RNS, Phosphoprotein). Anfangs befindet sich an der Spitze ungefähr gleich viel DNS und Phosphoprotein wie an der Basis, doch mehr RNS (1). Die Änderungen der Phosphatspiegel während des korrelativen Alterns (vgl. 1 mit 2) finden daraufhin fast ausschließlich in der RNS-Fraktion statt. Diese baut auch als einzige etwas ^{32}P ein, wie es aus den verhältnismäßig hohen spezifischen Aktivitäten ersichtlich ist (Zahlenwerte in der Abb. 26 = $\%$ ^{32}P /mg Phosphat).

Kinetinbehandlung der Lieferregion (3A) erhält den ursprünglichen RNS-Spiegel; Behandlung der Basis (4B) beschleunigt seine Zunahme dort auf das Doppelte der ursprünglichen Menge und verstärkt auch etwas den Abbau an der Spitze (4A). Alle diese Veränderungen aber sind lediglich Unterschiede in der Bilanz eines dynamischen Gleichgewichts, denn die RNS ist im Gegensatz zur DNS auch in alternden Zellen noch in ständigem Umbau begriffen (vgl. BÖTTGER, 1958). Kinetin könnte also die synthetische Aktivität stimulieren (WOLLGIEHN, 1961; OSBORNE, 1962); die Zunahme der spezifischen ^{32}P -Aktivitäten der RNS in "3A" und "4B" spricht dafür. Ein schlüssiger Beweis kann darin aber noch nicht gesehen werden, da der stimulierte Einbau in die RNS mit der (spezifischen) Aktivität der Vorläufersubstanzen, der Mononucleotide, in Beziehung gesetzt werden muß.

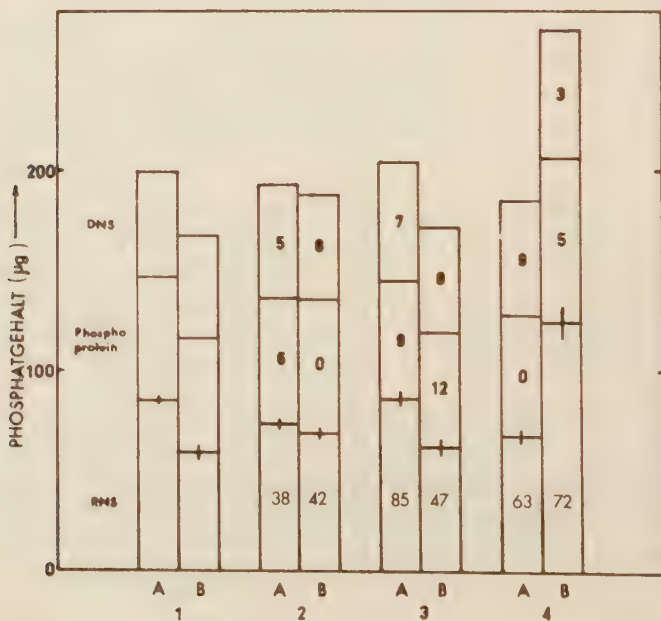


Abbildung 26: Änderungen der alkalilöslichen Phosphate während des korrelativen Alterns.

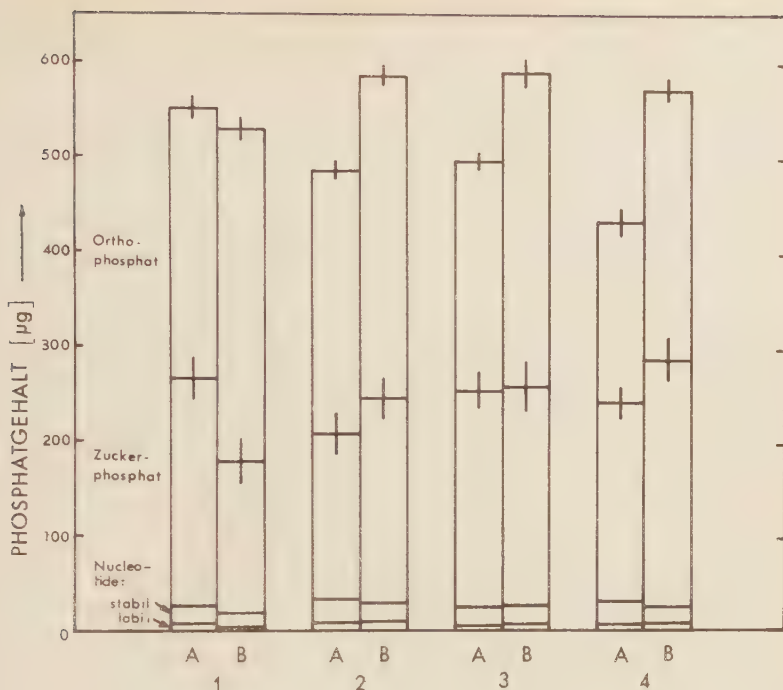


Abbildung 27: Änderungen der säurelöslichen Phosphate während des korrelativen Alterns.

Abbildung 27 enthält die Analyse der säurelöslichen Phosphate (Orthophosphat, säurelabiles und -stabiles Phosphat der Nucleotide, und "Zuckerphosphate").

In der Frischkontrolle besitzt die Blattbasis mehr unverestertes anorganisches Phosphat als die obere Blatthälfte, doch weniger Nucleotide und Zuckerphosphat. Nach 30 Stunden korrelativen Alterns hat die obere Hälfte hauptsächlich "Zuckerphosphat" verloren (ca. 26%); die untere Hälfte hat es gewonnen, was aber nicht heißt, daß Zuckerphosphate wirklich transportiert werden.

Vergleicht man die Zusammensetzung der kinetinbehandelten Hälften mit derjenigen der Kontrollhälften (3A mit 2A und 4B mit 2B), so stellt man fest, daß als Folge der Kinetinbehandlung die Konzentration des Orthophosphats zugunsten des Zuckerphosphats reduziert ist. Das Verhältnis Orthophosphat/Zuckerphosphat sinkt zum Beispiel in den oberen Blatthälften von 1.6 auf 1.0, in den basalen Hälften von 1.6 auf 1.1. Auch der Gehalt an Nucleotiden ist durch die Kinetin-

wirkung an der Spitze um etwa 30%, an der Basis um ungefähr 20% gesunken. Die Unterschiede sind klein; sie traten aber auch in zwei Wiederholungsexperimenten auf.

Abbildung 28 zeigt die spezifischen Aktivitäten der Phosphatfraktionen. Die Einzelwerte wurden eingetragen und so angeordnet, daß die allgemeine Tendenz sichtbar wird: Die höchsten spezifischen Aktivitäten besitzen die Nucleotide, besonders die energiereiche, säurelabile Fraktion. Dann nehmen sie ab in der Folge: "Zuckerphosphate", Orthophosphat, RNS, Lipide, Phosphoprotein und DNS.

Unter der Wirkung des Kinetins werden die spezifischen Aktivitäten der Nucleotide fast auf die Hälfte und auch die der Zuckerphosphate um ca. 40% verringert.

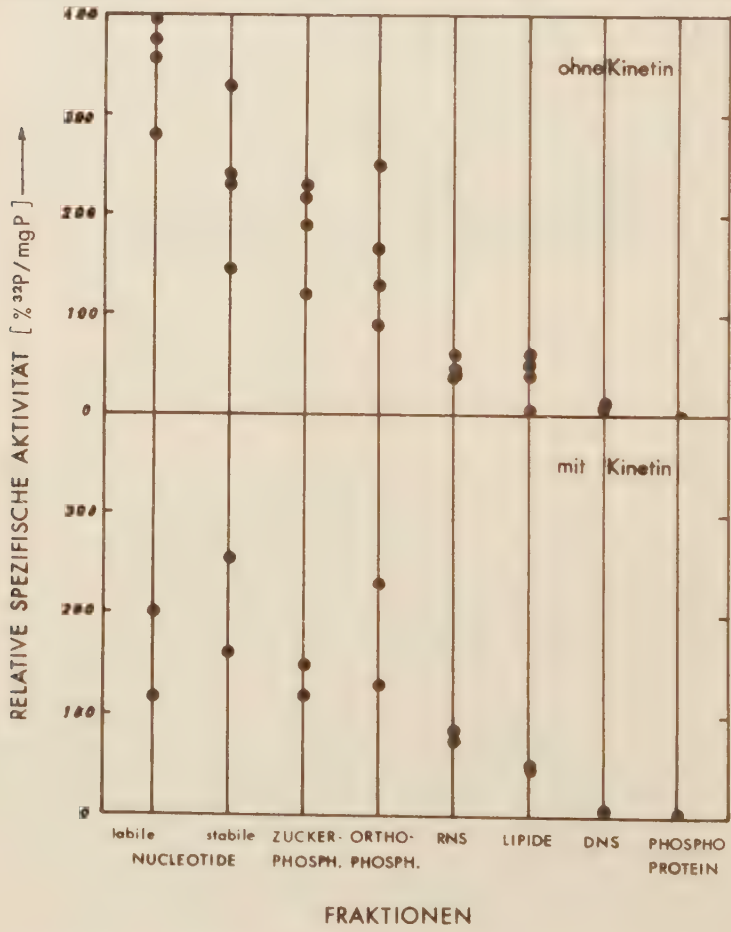


Abbildung 28: Spezifische ³²P-Aktivitäten der Phosphatfraktionen.

Wenn also trotzdem die Inkorporation von ^{32}P in die RNS durch Kinetin stimuliert wird (vgl. die spezifischen Aktivitäten in Abb. 26), so kann das nicht durch eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der Vorläufer (Nucleotide) zustande gekommen sein, sondern durch eine Beschleunigung der Synthesereaktion. Die Tatsache, daß der Nucleotidgehalt durch Kinetineinwirkung verringert ist, fügt sich dann auch sinnvoll ein als eine Folge des schnellen Verbrauchs.

Aus der Reihenfolge der spezifischen Aktivitäten läßt sich nach folgenden Überlegungen noch ein Hinweis zum Problem des Akkumulationsmechanismus ableiten: Das meiste ^{32}P in den untersuchten Blattabschnitten ist, -30 Stunden nach Beginn des Transports-, im Gewebe fixiert (vgl. S. 40). Daher bezieht sich Abb. 28 auf die Markierung der Phosphate im Parenchym, nicht auf die der Phosphate im beweglichen Inhalt des Phloems. Diese ^{32}P -Fraktionen sind nun wegen der ständigen Aufnahme von ^{32}P in das Gewebe nicht im Equilibrium. Das heißt aber, daß die höchste spezifische Aktivität im primären Akkumulationsprodukt zu finden ist. Nach Abb. 28 wären das die Nucleosid-Di- oder Triphosphate. Dies gilt unter zwei Bedingungen:

- 1) Die Zellen, welche das ^{32}P zuerst aufnehmen, müßten denselben Stoffwechsel haben wie der analysierte Durchschnitt des Gewebes.
- 2) Die Fraktionen dürfen keine großen nichtmetabolischen Pools enthalten, welche eine zu niedrige spezifische Aktivität vortäuschen würden.

Wenn man nun annimmt, daß die energiereichen Nucleotide wirklich die ersten Träger des akkumulierten ^{32}P darstellen, so steht man doch noch vor zwei Möglichkeiten: Entweder wandert das ^{32}P -Nucleotid als solches aus dem Phloem in die umliegenden Zellen, oder es wird in der Reaktion, die den Durchtritt durch semipermeable Plasmaschichten reguliert, erst gebildet. So könnte etwa ein Phosphorylierungsmechanismus anorganisches ^{32}P aus dem Phloemsaft in die Zellen schleusen. Der Eintritt von ^{32}P -Orthophosphat in die Zellen der Blattoberfläche könnte dann einen Parallelfall der Akkumulation des transportierten ^{32}P darstellen.

3. Aufnahme und Einbau von ^{32}P -Orthophosphat:

Wenn die Oberfläche von Maisblättern mit einer Lösung von ^{32}P -Orthophosphat in Berührung gebracht und die aufgenommene Radioaktivität nach kurzen Zeitintervallen gezählt wird, so findet man, daß das radioaktive Phosphat zuerst sehr rasch und später, nach ca. 30 Sekunden, langsamer und mit konstanter Geschwindigkeit absorbiert wird. Der anfängliche steile Anstieg entspricht wahrscheinlich nur einer nichtmetabolischen Aufnahme in den Diffusionsraum, einer Adsorption oder einem "Adsorptionsaustausch" (LATIES, 1959). Die nachfolgende, mit geringerer und konstanter Geschwindigkeit verlaufende Absorption

läßt dagegen eine Regulierung durch den Stoffwechsel vermuten. Am Kriterium des Sättigungswerts der Konzentration sollte diese Annahme im folgenden Versuch bestätigt werden.

Vergleichbare Blätter erhielten je einen Tropfen mit $0.1 \mu\text{C } ^{32}\text{P}$. Die Lösung des Isotops war bei der einen Serie carrierfrei; bei der anderen war das ^{32}P in einem 0.025 M Phosphatpuffer enthalten. Die Phosphatkonzentration war damit um den Faktor 10^4 vervielfacht. Nach einem Tag Transportzeit wurden die Tropfen abgewaschen und die Blätter über den Scanner gezogen (Abb. 29).

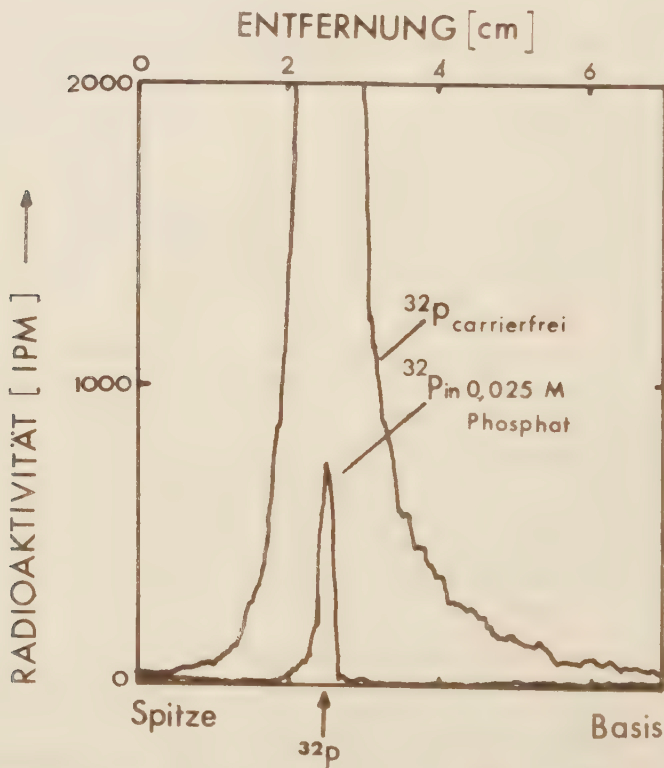


Abbildung 29: Aufnahme und Transport von ^{32}P verschiedener spezifischer Aktivität.

Abb. 29 zeigt, daß von der Lösung mit niedriger spezifischer Aktivität im Gegensatz zur carrierfreien Kontrolle kaum etwas ^{32}P in das Transportsystem eingetreten war. Die geringe vorhandene Aktivität war zum großen Teil wahr-

scheinlich nur an der Fütterungsstelle adsorbiert. Es gibt also für die Phosphataufnahme einen Sättigungswert der Konzentration, -ein Kennzeichen metabolischer Steuerung. Auch die Phosphataufnahme von Kartoffelgewebe (BIELESKI und LATIES, 1963) und von Hefe (BORST PAUWELS, 1962) weist einen solchen Sättigungswert auf und wird, wie Hemmstoffversuche es beweisen (vgl. LATIES, 1959; MARRE, 1961), durch die Aktivität des Stoffwechsels in Gang gehalten.

Ähnlich der metabolischen Aufnahme transportierten Phosphats wird nun auch die metabolische Aufnahme von anorganischem ^{32}P aus einer Lösung durch Kinetin gefördert (PARTHIER und WOLLGIEHN, 1961; SUGIURA, 1963). Das folgende Experiment bestätigt dies.

Je 0.2 g Blattscheiben wurden auf 10 ml einer Lösung schwimmen gelassen, die $34 \mu\text{C } ^{32}\text{P}$ (1200 mc/mM) und Kinetin (0, 0.1, 1, und 10 mg/l) enthielt. Das Verschwinden von ^{32}P aus der Lösung wurde zu verschiedenen Zeiten gemessen (Abb. 30).

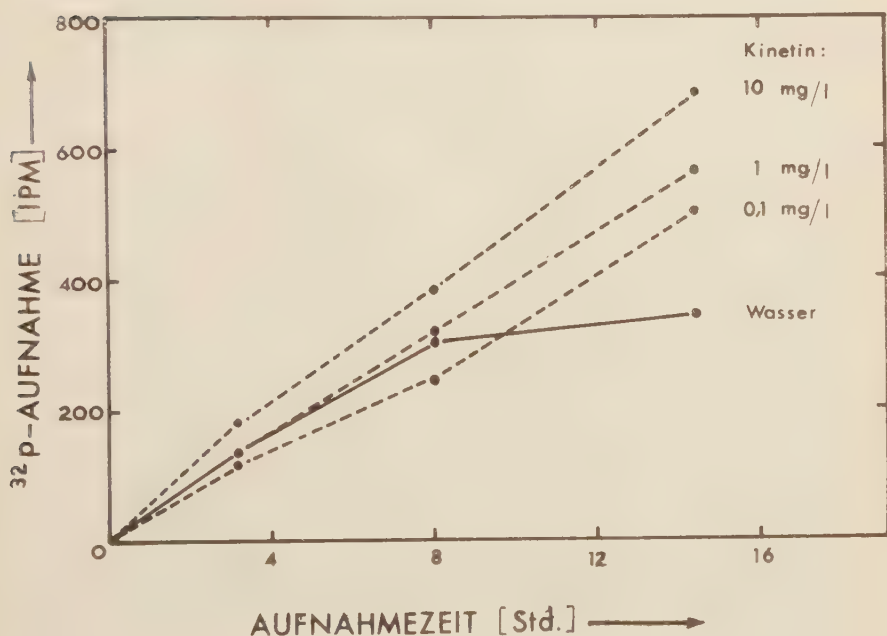


Abbildung 30: Einfluß des Kinetins auf die Aufnahme von ^{32}P -Orthophosphat durch Blattscheiben

Die durchschnittliche Aufnahmeleistung betrug $4 \cdot 10^{-8} \mu\text{M}/\text{Std.}/\text{cm}^2$. Kinetin stimulierte nicht so sehr die Absorption von Anfang an, sondern verhinderte vielmehr den Verlust der Aktivität, der in der alternierenden Kontrolle eintrat. Um den Vergleich zwischen ^{32}P -Akkumulation und Aufnahme von ^{32}P -Orthophosphat zu vervollständigen, wurden nun auch die Phosphatspiegel und die Verteilung des ^{32}P in den verschiedenen Fraktionen bestimmt.

Primärblattstücke von 13 Tage alten Pflanzen (0.5 g pro Probe) wurden auf Wasser oder Kinetinlösung (1 und 10 mg/l) 8, 14 und 25 Stunden lang schwimmen gelassen. Danach wurden sie eine Stunde lang mit carrier-freiem ^{32}P -Orthophosphat ($10 \mu\text{C}/\text{ml}$) gefüttert, mit Wasser abgespült und eine Stunde in destilliertem Wasser geschüttelt. Sie wurden dann auf Kohlensäureeis eingefroren und auf Phosphatgehalt und ^{32}P -Verteilung hin untersucht. DNS und Phosphoprotein wurden jedoch nicht mehr analysiert, da sie nicht auf Kinetin reagiert hatten (Abb. 26). Die Ergebnisse sind in den Abb. 31 und 32 wiedergegeben.

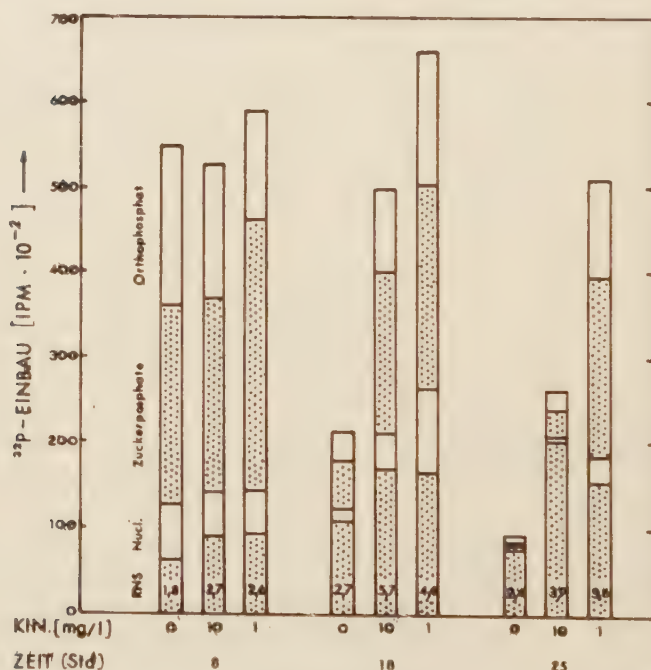


Abbildung 31: Aufnahme und Verteilung von ^{32}P in Blattscheiben

In Abb. 31 sind die Aufnahme und die Verteilung von ^{32}P in Blattscheiben wiedergegeben. Zunächst ist festzustellen, daß -entsprechend Abb. 30- die Fähigkeit der Blattscheiben, anorganisches ^{32}P zu absorbieren, bei der alternierenden Kontrolle (9-18-25 Std) schon während des ersten Tages nach der Isolierung größtenteils verloren geht. Kinetin in einer Konzentration von 10 mg/l, oder besser noch von 1 mg/l, erhält sie jedoch.

Ein anderer, spezieller Effekt des Kinetins liegt wieder im stimulierten Einbau von ^{32}P in die RNS, in einer Zunahme der absoluten Menge der Radioaktivität wie auch der spezifischen Aktivität (Zahlenwerte in Abb. 31 = ipm/% Phosphat). Wenn man den Einbau in die RNS auf der Basis der Gesamtaufnahme berechnen würde, so würde sich überraschenderweise der höchste Wert bei der alternierenden Kontrolle (0/25 Std.) ergeben. Es ist aber kaum anzunehmen, daß die synthetische Leistung hier tatsächlich am höchsten ist. Vielmehr dürfte die RNS-Fraktion bei der Fütterung radioaktiven Phosphats durch festadsorbierte Spuren carrierfreien ^{32}P -Phosphats verunreinigt sein, die nur durch längeres Waschen und wiederholte Fällungen entfernt werden können (SCHMIDT 1957).

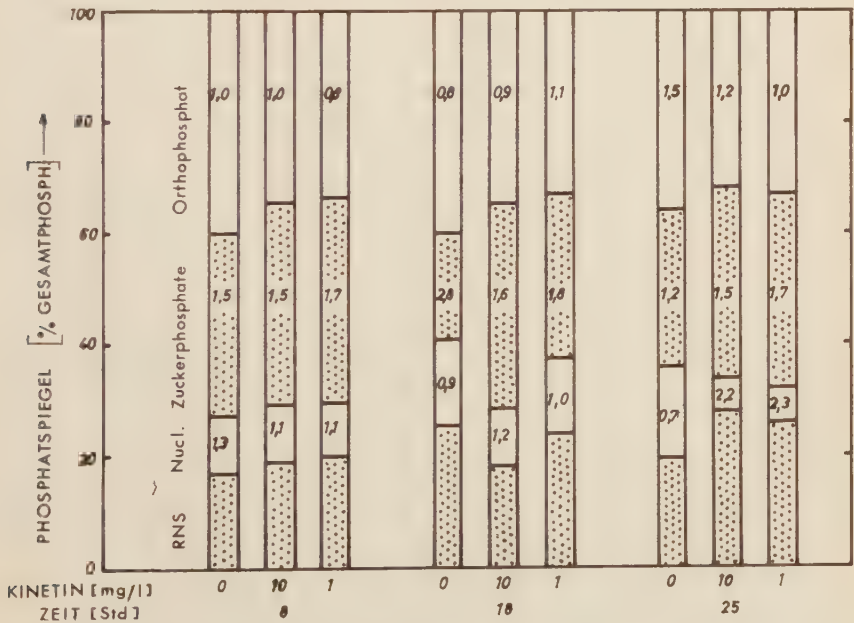


Abbildung 32: Phosphatspiegel in kinetinbehandelten und unbehandelten Blattscheiben.

Abbildung 32 zeigt die Phosphatspiegel und die dazugehörigen spezifischen Aktivitäten in kinetinbehandelten und unbehandelten Blattscheiben.

Die Zusammensetzung des Phosphatbestandes wird während des Alterns der Kontrolle (9-18-25 Std.) überraschenderweise kaum geändert, während doch die Phosphataufnahme so stark reduziert wird. Die Behandlung mit Kinetin führt dagegen zu einer leichten Verlagerung der Phosphatspiegel, wie sie schon bei der vorhergehenden Phosphatanalyse (Abb. 27) festgestellt wurde: Der Gehalt an Nucleotiden und Orthophosphat wird verringert und der Zuckerphosphatspiegel steigt an. Die Feststellung, daß der Zuckerphosphatspiegel nach Kinetinbehandlung zunimmt, gilt aber nur mit einem gewissen Vorbehalt; denn dieser Effekt ist kein unveränderliches Kennzeichen der Kinetinwirkung. Er kann unter geänderten äußeren Bedingungen leicht verschwinden. So wurde der Gehalt an "Zuckerphosphaten" durch Kinetin sogar verringert, wenn die Blattstücke im Dunklen liegengelassen wurden. Chlorophyllinseln besitzen sicher eine bessere photosynthetische Leistung als die umliegenden Teile der Blätter, so daß wohl Unterschiede der Beleuchtung die Charakterisierung des kinetin-induzierten Stoffwechsels stören können. Wieweit aber die Variabilität der Zuckerphosphate durch Änderungen der Lichtintensität verursacht wurde, ist nicht bekannt.

Die Zahlenwerte in Abb. 32 bezeichnen die relativen spezifischen Aktivitäten, i. e. $\% \text{ lös. } ^{32}\text{P} / \% \text{ lös. Phosphat}$. Wegen der zweifelhaften Bedeutung des ^{32}P in der RNS-Fraktion wurden die relativen spezifischen Aktivitäten nicht auf die Gesamtmenge des radioaktiven Phosphats bezogen, sondern auf das gesamte lösliche ^{32}P . Die höchsten Werte fanden sich in den "Zuckerphosphaten" (durchschnittlich 1.7). Bei den Nucleotiden (Durchschnitt: 1.2) lagen sie nahe bei denen des Orthophosphats (Durchschnitt: 1.0). Wie auch im Falle des Einbaus transportierten Phosphats (Abb. 28) scheinen also organische Phosphate wegen ihrer hohen spezifischen Aktivität die Aufnahmeformen des ^{32}P zu sein. Die verhältnismäßig niedrigen Werte der Nucleotide widersprechen hier nicht der Hypothese, daß diese Fraktion eigentlich die ersten Akzeptoren des anorganischen ^{32}P stellt; denn die spezifische Aktivität der Nucleotide dürfte sich während der einstündigen Waschzeit nach der Fütterung mit der des Orthophosphats ziemlich rasch ausgeglichen haben; Nucleotide werden gewöhnlich am schnellsten umgesetzt (z. B. BIELESKI und LATIES, 1963). Was die Wirkung des Kinetins auf die ^{32}P -Verteilung im Löslichen betrifft, so sind keine nennenswerten Unterschiede der relativen spezifischen Aktivitäten festzustellen. Das bedeutet, daß das Gleichgewicht des Stoffwechsels der löslichen Phosphate durch Kinetin nicht einseitig in eine Richtung verschoben wird. Wenn Kinetin die Phosphataufnahme stimuliert, so heißt das also nicht, daß es nur gewisse Phosphorylierungsprozesse, sondern wahrscheinlich den Umsatz der löslichen Phos-

phate im allgemeinen beschleunigt.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche seien noch einmal kurz zusammengefaßt: Einerseits zeigen sie, daß die Aufnahme von ^{32}P -Orthophosphat der Akkumulation transportierten radioaktiven Phosphats in verschiedenen Zügen ähnelt und daß sie als deren Modellfall betrachtet werden kann; Sie wird durch Kinetin stimuliert (oder besser: erhalten), ist metabolisch gesteuert und beruht - den hohen spezifischen Aktivitäten organischer Phosphate nach zu schließen - auf Phosphorylierungsvorgängen. Mit der Interpretation der vorliegenden Versuchsergebnisse wird aber zugleich noch ein weiteres Problem berührt, nämlich die Frage nach der Wirkung des Kinetins auf den Phosphatstoffwechsel. So lassen besonders die Messungen der spezifischen ^{32}P -Aktivitäten in der RNS und ihren Vorläufern auf eine Förderung der RNS-Synthese durch Kinetin schließen. Ein Merkmal der Kinetinwirkung ist dann weiterhin der erhöhte Umsatz der löslichen Phosphate, der letzten Endes auch für die Akkumulierung von ^{32}P am Kinetinort verantwortlich sein dürfte. In ihrer Bilanz ergeben die kinetinbedingten Veränderungen des Phosphatstoffwechsels eine Verringerung der Orthophosphat- und Nucleotidkonzentration und meist eine Zunahme der "Zuckerphosphat"-Fraktion.

D. RIBONUCLEASE-AKTIVITÄT IN ALTERNDEN BLÄTTERN

Der Einfluß des Kinetins auf den RNS-Stoffwechsel läßt vermuten, daß hier vielleicht die primären Alterungsprozesse ausgelöst oder durch Kinetin unterdrückt werden. Charakteristisch ist der RNS-Abbau in alternden Pflanzenorganen, der als Komponente des RNS-Umsatzes jedoch nicht direkt bestimmt werden kann. Es liegen nur Bilanzmessungen vor (VARNER, 1961; CHERRY und HAGEMAN, 1961; OSBORNE, 1962) oder Untersuchungen über das Auftreten extrahierbarer Abbau-Enzyme (Ribonucleasen; abgekürzt: RNasen) während des Alterns (CHERRY et al., 1962; KESSLER und ENGELBERG, 1962; HANSON et al., 1963). Durch Bestimmung von RNase-Aktivitäten in Blatthomogenaten sollte versucht werden, indirekte Hinweise auf mögliche Änderungen des RNS-Abbaus während des korrelativen Alterns zu erhalten, besonders aber auf den RNS-Abbau in Kinetinzentren.

Sekundärblätter 13 Tage alter Maispflanzen wurden nach ähnlichem Aussehen geordnet und in vier Gruppen aufgeteilt, die nach dem gleichen Schema präpariert wurden wie die Blätter für den Versuch in Abb. 34 (doch ohne ^{32}P). RNase-Aktivitäten wurden in den Homogenaten der

Spitzen- und Basishälften zwei Tage nach Isolierung ermittelt (siehe methodischen Teil). a = Frischkontrolle; b, c, d; zwei Tage nach Isolierung; b = Kontrolle; c = mit kinetinbehandelter Spitzenhälfte; d = mit kinetinbehandelter basaler Hälfte.

In Abb. 33 sind die Gesamtaktivitäten der zu vergleichenden Blattabschnitte (anfänglich ungefähr je 2 g Frischgewicht) aufgetragen.

Die Frischkontrolle (1) enthält insgesamt und auf der Basis des Frischgewichts mehr RNase im oberen als im basalen Teil des Blattes. Zwei Tage später aber hat die Enzymaktivität an der alternden Spitze noch mehr zugenommen (2), besonders dann, wenn die mobilisierende Kraft der Basis durch Kinetin verstärkt worden war (4). Die basale RNase-Aktivität wird während des korrelativen Al-

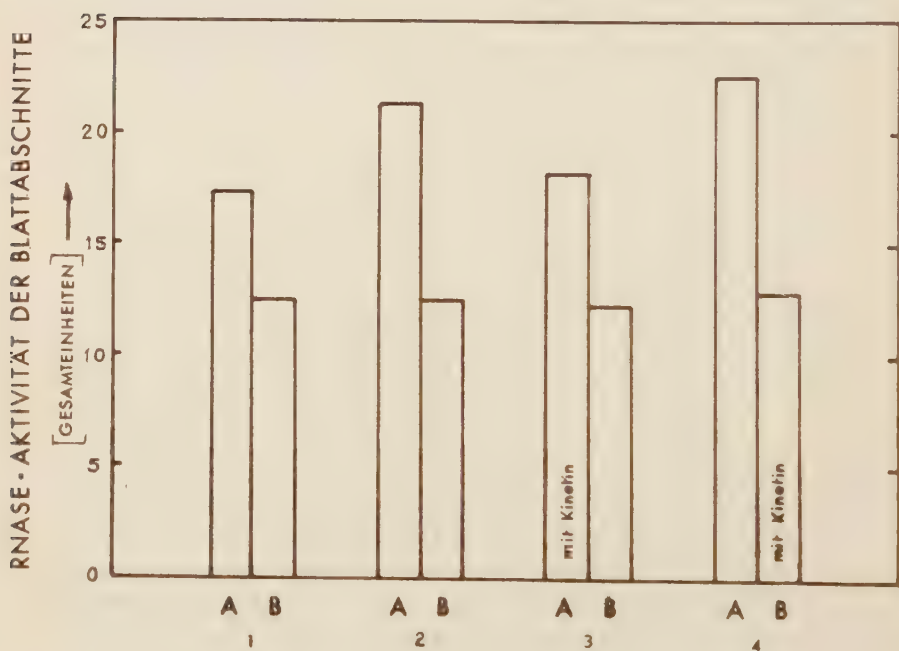


Abbildung 33: Ribonuclease-Aktivität in alternden Maisblättern

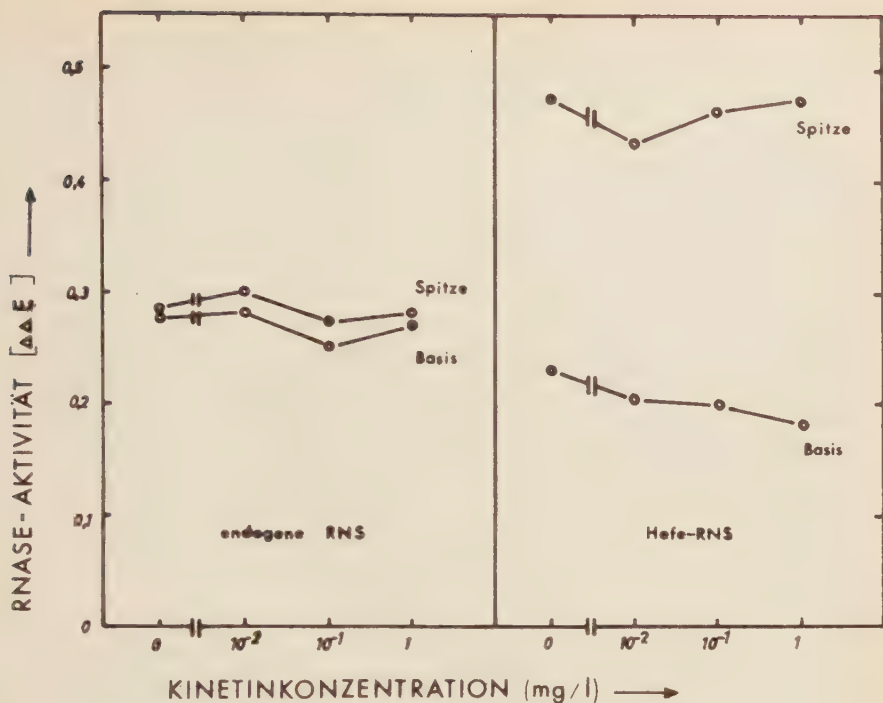


Abbildung 34: Einfluß von Kinetin auf die Ribonuclease-Aktivität in Maisblatthomogenaten

terns nicht geändert, auch dann nicht, wenn das Gewebe Kinetin erhalten hatte. Kinetin an der Spitzenhälfte verhindert dort aber die Zunahme der RNase, die in der alternden Kontrolle zusätzlich auftritt. Wahrscheinlich gibt es verschiedene Typen von Ribonucleasen in Pflanzenmaterial, verschieden verteilt in der Zelle und vielleicht mit verschiedenen Funktionen (z. B. KESSLER und ENGELBERG, 1962; WILSON, 1963). Kinetin scheint jedoch in den Maisblättern gerade diejenige RNase-Aktivität zu unterdrücken, deren Auftreten für das Altersstadium typisch ist.

Es bestand nun die Frage, ob die Enzymaktivität der Spitze direkt durch Kinetin gehemmt wurde, oder ob ihre Abnahme erst als Folge einer anderen Kinetinreaktion auftrat. MACIEJEWSKA-POTAPCZYK (1959) berichtete eine in-vitro-

Stimulierung der RNase in Homogenaten von Bohnenhypocotylen durch Kinetin. Dies ist das Gegenteil des erwarteten Resultats. Hypocotyle sind aber kein altern- des Gewebe. Sie könnten eine andere Art von RNase enthalten wie die Maisblät- ter und daher auf Kinetin anders reagieren. In der Tat fanden auch SHANNON und KEY (1963) an Hypocotylen von Soyabohnen eine Hemmung der RNS-Syn- these durch Kinetin statt der Förderung, die in alternenden Blättern gewöhnlich be- obachtet wird. Der Einfluß des Kinetins (in verschiedenen Konzentrationen) auf die RNase-Aktivität wurde deshalb noch einmal in Maisblatthomogenaten unter- sucht, wobei einmal Hefe-RNS und andererseits die blatteigene RNS als Substra- te benützt wurden. Wie es aus den Ergebnissen in Abb. 34 ersichtlich ist, wird die RNase nicht gefördert durch Zusatz von Kinetin zum Reaktionsmedium (aus- ser durch 10^{-2} mg/l Kinetin beim Abbau endogener RNS). Im Gegenteil: Die für die Chlorophyllerhaltung optimale Konzentration von 0.1 mg/l Kinetin wirkt stets leicht hemmend. Doch ist der Effekt sehr gering (ca. 10% Hemmung).

IV. BESPRECHUNG

Das partielle Absterben der Pflanzen erfolgt nach einem bestimmten Schema, das man besonders bei einjährigen Kräutern deutlich erkennt. So schreitet der Chlorophyllabbau bei den Blättern in der Regel von der Spitze zur Basis hin fort (vgl. ESTERAK, 1935). Wie es am Beispiel des Maisblattes gezeigt wurde, wird dieser regelmäßige Ablauf des Alterns durch korrelative Beziehungen festgelegt. Es erscheint selbstverständlich, daß irgendwelche Transportprozesse den Korrelatio- nen zugrundeliegen müssen. Hinsichtlich der Art des Stofftransports und seines Zusammenhangs mit dem Alterungsvorgang bestanden jedoch seit längerem ver- schiedene Auffassungen. Während man einerseits eine "Vergiftung" der alternenden Organe für möglich hielt (z.B. KÜSTER, 1921), wurde andererseits - besonders beim Altern der Blätter während der Fruchtentwicklung - die Hypothese vertreten, daß eine Verlagerung von Nährstoffen zum "Erschöpfungstod" der Lieferorgane führe (z.B. MOLISCH, 1929). Zugunsten dieses mehr ökonomischen Prinzips sprach schließlich der Befund von MOTHES et al., (1959), daß eine Kinetinbehandlung von Blattbezirken korrelative Alterungseffekte und zugleich auch die entspre- chenden Stoffverlagerungen hervorrufen kann ("gerichteter Transport", "Mobili- sation"). Wie die löslichen Stickstoffverbindungen in Tabakblättern (MOTHES et al., 1959), so werden auch kleinmolekulare Phosphate in Maisblättern wäh- rend des korrelativen Alterns verschoben, und da gefüttertes radioaktives Phos- phat eben dieses bewegliche Material markiert, stellt der ^{32}P -Transport ein Maß der Alterungs-Korrelationen dar.

Wird ein Stofftransport auf ein kinetin-induziertes oder natürliches "Mobilisationszentrum" hin in Bewegung gesetzt, so hat das für den Alterungsvorgang eine doppelte Konsequenz:

1) Das abgebende Gewebe verliert Stoffe, die notwendig wären für seine Erhaltung; der Verfall wird beschleunigt. Wie die Messungen des ^{32}P -Transports an Maisblättern zeigten (Kap. A/4), wird der Vorgang zwar vom mobilisierenden Zentrum induziert und in Gang gehalten, doch hängt die Lebensdauer des abgebenden Bereichs auch von dessen Widerstandsfähigkeit ab.

2) Der mobilisierende, aufnehmende Gewebeteil gewinnt brauchbare Stoffe. Es wurde gefunden, daß in einem Kinetinzentrum die Zufuhr von Material die Entwicklung der Kinetinreaktion fördert. Rückwirkend verstärkt sich dadurch wiederum die mobilisierende Kraft. Welche Substanzen für die Alterung oder Erhaltung der Zellen kritisch werden können, ist nicht bekannt. Möglicherweise gehören auch RNS-Vorläufer dazu, da die für die Kinetinwirkung charakteristische RNS-Synthese in ihrem Ausmaß von der Menge des akkumulierbaren Materials abhängt (vgl. auch: MOTHES et al., 1959; WOLLGIEHN, 1961a).

Einmal begonnen, wird der Mobilisierungsvorgang sich also selbst verstärken. Anfangs winzige Unterschiede in der mobilisierenden Kraft, wie sie an manchen Stellen der Blätter zu finden sein mögen, können durch diesen Mechanismus vergrößert werden. Die Blätter altern deshalb selten einheitlich, sondern bilden immer ein Muster absterbender gelber und akkumulierender grüner Regionen. Es ist weiterhin auch verständlich, daß der Mobilisierungsvorgang nach dem Prinzip "alles oder nichts" verlaufen muß, daß die Induktion des gerichteten Transports kaum von der Konzentration des Kinetins abhängt, solange sie nur zum ersten Anstoß genügt. Auch MOTHES (1960) bemerkte, daß eine zehnfache Besprühung mit Kinetinlösung einer zweifachen nicht überlegen war.

Die wesentlichen Züge der Mobilisation lassen sich erst an ihrem Modellfall, dem kinetin-induzierten gerichteten Transport, deutlich erkennen. Zwei Teilvorgänge wurden anhand der Transportversuche und der ^{32}P -Verteilungskurven zuerst rein formell, später auch experimentell unterschieden:

- 1) eine Akkumulation von Substanzen, z. B. von ^{32}P , am Kinetinort,
- 2) eine Induktion oder Stimulierung des zum Mobilisationszentrum gerichteten Transports.

Genauer: Es handelt sich hier um eine Beschleunigung des Phloemtransports, der die Wanderung des radioaktiven Phosphats vermittelt und im allgemeinen auch der Träger der Alterungs-Korrelationen ist (Kap. B/1).

Grundsätzlich wären für die Transportmechanik zwei Modelle denkbar. Entweder werden die im Phloemsaft gelösten Stoffe in der strömenden Flüssigkeit mitgezogen (schon Malpighi vertrat 1686 diese Anschauung als eine Parallele zum Blutkreislauf der Tiere; auch in Pflanzen könnte eine Art osmotischer Pumpe den Saft in Bewegung halten; z.B. Münch, 1927 - oder aber die Stoffe bewegen sich als Einzelmoleküle, etwa durch Diffusion. Konzentrationsgradienten, Ursache des Diffusionspotentials, könnten dabei durch Umformung der diffundierenden Substanzen im Empfängergerewebe aufrechterhalten werden (MULDER, 1844; MASKELL und MASON, 1929; PHILLIS und MASON, 1933; MASON und PHILLIS, 1937). Daß für die Kinetinwirkung jedoch die Hypothese in dieser Form nicht zutreffen kann, wurde schon von MOTHES (1960, 1961) betont; denn Stoffe wie Aminosäuren werden am Kinetinort gegen einen Konzentrationsgradienten akkumuliert. Es ist aber leicht denkbar, daß ein besonderer Akkumulationsmechanismus an der Kinetinstelle nur die Entladung der Siebröhren besorgt und damit das Konzentrationsgefälle wenigstens innerhalb der Transportbahn erhält, so daß eine beschleunigte molekulare Bewegung dorthin erfolgt.

Verschiedene Befunde dieser Arbeit sprechen nun dafür, daß die Akkumulation von ^{32}P nicht direkt mit der Stimulierung des Transports im Zusammenhang steht, sondern daß mobilisierende Zentren eine Massenströmung auf sich lenken:

1) ^{22}Na wird am Kinetinort nicht akkumuliert, obwohl sein Transport gefördert wird. Der Änderung der Steigung der Verteilungskurve (log Radioaktivität/Entfernung) nach zu schließen, wäre die Beschleunigung in derselben Größenordnung wie bei dem Isotop ^{32}P .

2) Es gibt keine gleichzeitige bidirektionale Mobilisierung zwischen entgegengesetzten Zentren.

3) Bei Auswertung der "Radioaktivitätsprofile" nach einem Transportmodell stimmen beobachtete und für die Annahme einer Massenströmung vorausgesagte Änderungen der Kurve überein.

Die "mobilisierende Kraft" wäre damit der Zug oder Druck des Phloemsafts. Die zwangloseste Erklärung für solche Wasserbewegungen scheint ein osmotisches Potential zu liefern. Dabei bleibt jedoch immer noch die Entscheidung zwischen zwei Konstruktionsarten einer osmotischen Pumpe offen: einem Druckstromsystem (MÜNCH, 1927) oder einem einfachen Sog (vgl. PRINGSHEIM, 1906). Die beobachtete Hemmung der typischen polaren Alterung von Maisblättern durch einen Evaporationsgradienten (Kap. B/3) stellt ein positives Argument dar für den Sogmechanismus. In dieselbe Richtung deuten auch Messungen der osmotischen Potentiale in Pflanzen (z.B. CURTIS, 1935). Diese sind stets höher in Empfänger- als in Lieferorganen und könnten vielleicht auch die

Wasserverschiebungen in intakten Pflanzen verursachen. Allerdings kann man sich schwer vorstellen, daß der Überschuß der Flüssigkeit in zirkulierender Bewegung wieder zurückgepumpt wird, wie das nach der Druckstromtheorie geschieht. Er könnte vielleicht in den nach Kinetinbehandlung anschwellenden Zellen (KURAISHI und OKUMURA, 1956) gespeichert werden. Das Problem des Mobilisationsmechanismus muß jedoch an diesem Punkte offen bleiben.

Die Eigenschaften des transportierenden Systems, die in den Grundzügen angeführt wurden, kommen schließlich in dem räumlichen Muster des Alterns und der ³²P-Mobilisation zum Ausdruck: mehrere beieinanderliegende Zentren konkurrieren um das (unidirektionale) Transportsystem. Richtung und Menge des resultierenden Stofftransports hängt dann von dem Vergleich der Konkurrenzkräfte ab. Diese können sich auch gegebenenfalls die Waage halten. Doch wird ein bestehendes Übergewicht sich gleichsam autokatalytisch vergrößern, und der Alterungsprozeß wird von der Stelle des geringsten Widerstandes her fortschreiten. Anatomisch begründete Wanderbarrieren, die zum Beispiel an der Verteilung radioaktiver Assimilate sichtbar werden (ARONOFF, 1955; JONES und EAGLES, 1962), können entgegen der Vermutung ENGELBRECHTS (1961) nicht überwunden werden.

Der Einfluß der Blattbasis auf das Altern der Spitze wird mehr oder weniger abgeschwächt, solange das Blatt an die ganze Pflanze angeschlossen ist. CHIBNALL (1954) vermutete deshalb die Existenz eines stofflichen Faktors, der von der Wurzel kommend die Proteinsynthese der Blätter aktiv erhält. KULAYEVA (1962) konnte durch wiederholtes Bestreichen von Tabakblattspreiten mit Wurzelexudat auf den behandelten Stellen auch tatsächlich "grüne Inseln" erzeugen. Ein Schluß auf das allgemeine Vorkommen eines "kinetinartigen Wurfelfaktors" dürfte jedoch deshalb allein nicht gerechtfertigt sein. In Maiswurzelexudat war keine solche Aktivität aufzufinden. Andererseits rufen sogar stoffwechselstörende Substanzen, wie die Entkoppler 2,4-DNP und CCP, eine lokale Erhaltung des Chlorophylls hervor. Dagegen sollte berücksichtigt werden, daß das korrelative Altern der Blätter über das Transportsystem selbst reguliert werden könnte. Die Wurzel könnte den Phloemtransport zur Basis hin bremsen oder sogar in die entgegengesetzte Richtung lenken, wie es ja auch wirklich in den ³²P-Verteilungskurven bei nichtisolierten Blättern angedeutet ist. Eine zur Basis gerichtete Massenbewegung im Phloem, die einem Gradienten der Saugkraft folgt (Saugkraft = osmotisches Potential - "Wanddruck"), könnte zum Beispiel dadurch beeinflusst werden, daß der Wurfeldruck der Differenz des osmotischen Potentials im Blatt einen Gradienten des Wanddrucks entgegensetzt. Phloemtransport reagiert auf Druckunterschiede (PEEL und WEATHERLEY, 1963). Daß andererseits auch ein kräftiger Wurfeldruck vorhanden ist, wird durch die Guttation der Maispflanzen angezeigt.

Sie nimmt bei alternden Blättern ab.

Das korrelative Altern ist lediglich die räumliche Differenzierung des Alterns, die durch Transportvorgänge erreicht wird. Sie entspricht aber beim kinetinbehandelten Blatt einem Kontrast des zellulären Alterns, denn der gerichtete Transport ist nicht die Voraussetzung für die verjüngende Wirkung des Kinetins; auch der Verfall von Blattscheiben wird durch eine Kinetinbehandlung ohne die Möglichkeit der Mobilisation für lange Zeit aufgehalten (MOTHES, 1961; OSBORNE und McCALLA, 1961; SUGIURA et al., 1962). Man neigt oft zu der Annahme, daß die primäre Ursache des zellulären Alterns eine chemisch kaum faßbare Veränderung etwa der tertiären Struktur von Makromolekülen sein könnte (Übersicht bei BJORKSTEN, 1962). Um so überraschender ist die Tatsache, daß geringe Mengen des Kinetins, einer einfachen, kleinmolekularen Verbindung, die Störung der Lebensfunktionen nicht nur verhindern, sondern zum Teil sogar rückgängig machen kann (RICHMOND und LANG, 1957; MOTHES et al., 1959; MOTHES, 1960). Anscheinend beruht der schnelle Verfall auf einem einzelnen Schritt des Stoffwechsels, der ziemlich spezifisch vom Kinetin beeinflusst wird.

Von diesem Gesichtspunkt aus erscheint die auffällige Anreicherung von ^{32}P am Kinetinort von besonderem Interesse, da sie mit dem Phosphatstoffwechsel verknüpft ist (Kap. C/1), der ja eine gewisse Schlüsselstellung einnimmt. Das transportierte radioaktive Phosphat wird metabolisch-selektiv aus dem Phloem in die umliegenden Zellen übertragen, wobei nach der Reihenfolge der spezifischen Aktivitäten die Nucleosidtriphosphate die ersten Produkte der akkumulierenden Reaktion darstellen (Kap. C/2). Ohne die Kenntnis der ^{32}P -Transportform ist es nun nicht zu entscheiden, ob diese Phosphate als solche ungeändert in das Gewebe übertreten, oder ob eine Phosphorylierung die Aufnahme anorganischen Phosphats steuert. Leider waren Versuche, den ^{32}P -Inhalt des Phloemsaftes der Maisblätter zu bestimmen, ohne Erfolg. In der Literatur finden sich aber bei anderen Objekten mehrere Angaben darüber: ZIEGLER (1956) berichtet über das Vorkommen einer ziemlich hohen Konzentration anorganischen Phosphats in Phloemexudat und über die Abwesenheit säurelabilen Phosphats. Auch ZIEGLER und KLUGE (1962) stellten das Fehlen von Nucleosidphosphaten fest, was wiederum dem Befund WANNERS (1953) entspricht, daß Phloemsaft hohe Adenosintriphosphatase- und Hexosephosphataseaktivitäten enthält. Weiterhin wird von TOLBERT und WIEBE (1955) und WITTEWERT und TEUBNER (1959) anorganisches ^{32}P als transportierte Form in Phloemexudat angegeben. Somit spricht alles dafür, daß bewegliches anorganisches Phosphat sich in den Siebröhren befindet, durch Phosphorylierung in Zellen der Umgebung fixiert wird und daß Kinetin diesen Vorgang fördert.

Eine analoge Versuchsanordnung bekräftigt noch die Hypothese: Kinetin beschleunigt die metabolisch regulierte Aufnahme radioaktiven Orthophosphats durch Blattzellen aus einer Lösung. Die äußere Aufnahme ist der "inneren" auch darin ähnlich, daß die spezifische ^{32}P -Aktivität organischer Fraktionen höher ist als die des Orthophosphats; das heißt, daß ein Phosphorylierungsmechanismus hier die Phosphatabsorption zu regulieren scheint. In verschiedenen pflanzlichen Geweben sind Nucleosidtriphosphate als die ersten organischen Produkte der Inkorporation radioaktiven Orthophosphats schon bestimmt worden (KURSANOW, 1960; BORST PAUWELS et al., 1962; BIELESKI und LATIES, 1963). Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung oder Hemmung der Atmungskette blockiert außerdem die Phosphataufnahme (LEGETT, 1961; HAGEN et al., 1957; JACKSON et al., 1962). Es ist zwar noch umstritten, ob die Absorption von Phosphat nur indirekt über den Elektronentransport von der Phosphorylierung abhängt (LUNDEGARDH, 1960) oder ob sie direkt daran gebunden ist (ROBERTSON et al., 1961; SUTCLIFFE und HACKETT, 1957; MARRE, 1961). Es genügt hier aber zu wissen, daß die Phosphataufnahme von der Aktivität der oxydativen Phosphorylierung abhängt und daß Kinetin diesen Mechanismus unterstützt.

Auf den ersten Blick könnte man die kinetin-induzierte Erhöhung des Zuckerphosphatspiegels und die Verringerung der Orthophosphatkonzentration (Kap. C/2, 3) als ein zusätzliches Argument für eine bevorzugte Phosphorylierung werten, doch ruft Kinetin keine signifikante Verschiebung der relativen spezifischen Aktivitäten hervor, während es die Gesamtaufnahme von ^{32}P -Orthophosphat so drastisch verändert. Der Wirkstoff induziert deshalb nicht eine einseitige Förderung der Phosphorylierungsaktivität, sondern beschleunigt anscheinend den Umsatz der löslichen Phosphate im allgemeinen.

Ein Teil des akkumulierten ^{32}P wird in den mobilisierenden Zentren auch in die säure-unlöslichen Substanzen eingebaut. Es ist speziell die Inkorporation in die RNS-Fraktion, die durch Kinetin erhöht wird. Die Zunahme der spezifischen Aktivität und eine gleichzeitige Nettozunahme der RNS-Mengen sind Anzeichen einer stimulierten RNS-Synthese. Für das Problem des Alterns sind solche Änderungen im RNS-Stoffwechsel von besonderer Bedeutung, nicht nur, weil die Nucleinsäuren mit zu den Grundbausteinen des lebenden Plasmas gehören, sondern auch, weil sich der RNS-Bestand regelmäßig beim Altern der Blätter verringert und auch wiederhergestellt wird, wenn das Leben eines Blattes durch Bewurzelung verlängert wird (WOLLGIEHN, 1961b). Daß der RNS-Spiegel in Blättern auch durch Kinetinbehandlung konserviert wird, ist von den Untersuchungen von WOLLGIEHN (1961a) und OSBORNE (1962) bekannt. Nach PARTHIER und WOLLGIEHN (1961) wird der Einbau der Radioaktivität von ^{14}C -

Glycin in RNS, DNS und Protein von Tabakblättern durch vorheriges Besprühen mit Kinetin gefördert. Radioaktives Phosphat wird ebenfalls schneller in die Nucleinsäuren inkorporiert (WOLLGIEHN, 1961a); und OSBORNE (1962) wies schließlich nach, daß nach der Fütterung markierter Orotsäure an Xanthium-blattscheiben die spezifische Aktivität der RNS bei den kinetinbehandelten Proben deutlich über derjenigen der Kontrollen lag. Sinnvolle Messungen des Einbaus sollten jedoch die spezifische Aktivität der Vorläufersubstanzen berücksichtigen, hier der freien Mononucleotide. Wenn es zum Beispiel zuträfe, daß Kinetin nur den Abbau der RNS hemmt, dann würde sich der Gehalt an freien Nucleotiden verringern, und man könnte sich vorstellen, daß diese Abbauprodukte (und Vorläufer zugleich) bei der Aufnahme radioaktiver Moleküle eine höhere spezifische Aktivität erreichen würden als in der Kontrolle. Bei gleicher synthetischer Leistung könnte somit mehr Aktivität in die RNS gelangen. Gehalt und spezifische Aktivität der Nucleotidfraktion wurde in Kinetinzentren von Maisblättern bestimmt und mit denen des unbehandelten Gewebes verglichen: Die absolute Menge von Nucleotiden war bei erhöhtem RNS-Gehalt geringer in den mobilisierenden Teilen; in ähnlicher Weise war bei höherer spezifischer Aktivität in der RNS die der Nucleotide niedriger (vielleicht als Folge der schnelleren Phosphorylierung und Equilibration mit anorganischem Phosphat). So scheint Kinetin tatsächlich eine echte Synthese anzuregen, nicht als Folge eines Überangebotes von Material, sondern auf Kosten der Vorläufersubstanzen. Trotzdem ist aber die Versorgung des Kinetinzentums mit Material von Bedeutung; denn sie ist der limitierende Faktor für das Ausmaß der Synthesen (Kap. C/2).

Da die Steigerung der synthetischen Tätigkeit unabhängig von der Bereitstellung der Substrate erfolgt, könnte die RNS der primäre Ort der Kinetinwirkung sein. Auffällig ist ja auch die Ähnlichkeit des Kinetins mit Adenin, die nicht ohne Bedeutung sein dürfte, da nach KURAISHI (1959) der Purinrest für die physiologische Wirksamkeit des Kinetins notwendig ist. Die Fähigkeit zur Phosphorylierung wäre dann wohl nur eine sekundäre Erscheinung. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die geringe Empfindlichkeit der kinetin-induzierten Mobilisation von ^{32}P gegenüber Entkopplern (unveröffentlicht). Diese erzeugen selbst auch schwache "grüne Inseln" auf Maisblättern; Basenanalogue dagegen, 8-Azaguanin und 5-Fluorourazil (10^{-3}M), hemmen die Entwicklung der Chlorophyllinseln und den gerichteten Transport von ^{32}P -Phosphat (unveröffentlicht). Sie hemmen auch die kinetin-induzierte Stimulierung der Zellteilung (MOEWUS, 1959) und die durch Kinetin geförderte Erhaltung des Chlorophylls in Blattscheiben (SUGIURA, 1963).

Irgendwo in der Kette der Kinetinwirkungen steht auch die Proteinsynthese. Proteine werden im alternden Blatt hydrolysiert (YEMM, 1956), und sie werden -

immer parallel zur RNS (WOLLGIEHN, 1961b) - im Falle einer "Blattverjüngung" durch Kinetin wieder aufgebaut (RICHMOND und LANG, 1957; THIMANN und LALORAYA, 1960; MOTHESE, 1960; SUGIURA et al., 1963). Es ist anzunehmen, daß die fehlerlos arbeitende Proteinsynthese eine Voraussetzung ist zur Lebensfähigkeit der Zelle. So führt die Behandlung eines Blattes mit dem Synthesehemmstoff Chloramphenicol auch zum Verfall des Gewebes (MOTHESE, 1961). Trotzdem kann Kinetin aber diese Störung des Stoffwechsels überwinden (MOTHESE, 1961; KULAYEVA und VOROBYEVA, 1962). KULAYEVA und VOROBYEVA (1962) schließen daraus, daß das Kinetin unmittelbar am System der Proteinsynthese wirksam wird und nicht etwa in der Aktivierung der Aminosäuren. Hier jedoch sind wiederum die RNS-Strukturen der Ribosomen und die lösliche RNS unmittelbar beteiligt. Auch im Falle der beobachteten Stimulierung der Proteinsynthese könnte somit der Angriffsort des Kinetins auf den RNS-Stoffwechsel zurückverlegt sein.

Im allgemeinen ist es wahrscheinlicher, daß eine in den Stoffwechsel eingeführte Substanz einen bestehenden Prozeß hemmt als daß sie eine Reaktion auf direktem Wege beschleunigt. Was die Kinetineffekte betrifft, die bei der Phosphataufnahme, der Atmung oder bei den Synthesen festgestellt wurden, so haben sie in der Tat alle mehr den Charakter einer Konservierung als einer absoluten Förderung. Die gelegentlich beobachteten Stimulierungen über die Frischkontrolle hinaus (z. B. OSBORNE 1962) lassen sich dadurch erklären, daß der Alterungsvorgang schon in dieser Kontrolle begonnen hatte. Nimmt man als Versuchsobjekt die wirklich lebenskräftigen Blätter, die noch mit der ganzen Pflanze in Verbindung stehen, so muß man feststellen, daß sie nicht auf Kinetin reagieren (auch erwähnt von MOTHESE, et al., 1959; WOLLGIEHN, 1961; KULAYEVA, 1962). KULAYEVA (1962) schlägt als Erklärung die Gegenwart eines stofflichen Faktors vor, der von der Wurzel in die Blätter transportiert werden und dort dem Kinetin entgegenarbeiten soll. Es genügt jedoch, anzunehmen, daß das Kinetin seinen Einfluß auf irgendeine Reaktion ausübt, die sich nicht vor Beginn des Alterns entwickelt.

Ein Enzymsystem des RNS-Stoffwechsels, das während des Alterns aktiviert und durch Kinetin zurückgedrängt wird, ist die Ribonuclease (RNase). Zwar wurden in Pflanzenmaterial verschiedene Typen von RNase gefunden (KESSLER und ENGELBERG, 1962; WILSON, 1963); und wahrscheinlich spielen sie nicht nur im Abbau, sondern auch im Aufbau der RNS eine Rolle (z. B. BARKER und DOUGLAS, 1960); doch tritt gerade während der typischen RNS-Degradation in alternden Maisblättern eine Vermehrung der Ribonuclease-Aktivitäten auf. Andererseits sind junge, sich teilende Zellen arm an RNase (Wurzelmeristeme: CHERRY et al, 1962; Tumore: DAOUST und AMANO, 1963) und zeigen typi-

sche Alterungserscheinungen, wenn man sie gereinigte RNase aufnehmen läßt: Verlust der Semipermeabilität und der Fähigkeit zur Phosphatakkumulation (HANSON, 1960; HANSON et al., 1963), Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung in Mitochondrien (HANSON, 1959), Schwund des unlöslichen und Vermehrung des löslichen Stickstoffes (ORITANI, 1962), Verringerung des RNS-Gehalts, besonders der Ribosomen-Fraktion, die direkt an der Proteinsynthese beteiligt ist (BRACHET, 1954, ARNSTEIN, 1961) und die auch in erster Linie von Kinetin betroffen wird (GUNNING und BARKLEY, 1963). Da jedoch die in-vitro-Hemmung der extrahierten RNase-Aktivität durch Kinetin ziemlich unscheinbar ist, bleibt es zweifelhaft, ob die Alterungs-RNase am Anfang der Kinetinwirkungsfolge stehen kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Verlauf des Alterns, gemessen am Verlust des Blattchlorophylls, wird korrelativ geregelt. Zwei verschiedene Beziehungen überlagern sich:
 - a) Die Basis des isolierten Blattes hat die Tendenz, sich auf Kosten der Spitzenzone die Vitalität zu erhalten. Diese Fähigkeit nimmt von der Spitze zur Basis hin kontinuierlich zu.
 - b) Durch den Anschluß an die Pflanze wird das korrelative Altern innerhalb der Blätter verzögert.
2. Ursache des korrelativen Alterns ist ein Stofftransport ("gerichteter Transport", "Mobilisation"), der hauptsächlich durch das Phloem vermittelt wird. Im isolierten Blatt wird er durch die asymmetrische Verteilung radioaktiven Phosphats (^{32}P) zur Basis hin dargestellt. Entsprechend der Verzögerung des korrelativen Alterns im Verband der ganzen Pflanze wird die Verlagerung von ^{32}P dort auch im gegenläufigen Sinne beeinflusst.
2. Behandlung eines Blattbezirks mit Kinetin (6-Furfurylaminopurin) schafft auch bei isolierten Maisblättern einen Modellfall der Mobilisation: Ein Kinetinzentrum in der Mitte des Blattes verursacht einen beschleunigten Verfall der anderen Teile, wobei es von dort Stoffe attrahiert. Am Beispiel des ^{32}P -Transports werden zwei Teilvorgänge des gerichteten Transports unterschieden:
 - a) Akkumulierung des radioaktiven Phosphats am Kinetinort ("Gipfel" in der Scanner-Kurve) und

b) Stimulierung des dorthin gerichteten Transports. Seine Gesamtleistung wird um das Vielfache (2-bis 20-Fache) gesteigert und die Geschwindigkeit, die gewöhnlich 1 bis 7 mm/Std. beträgt, um ca. 50% beschleunigt. Der Transport bleibt aber dabei an die Längsrichtung der parallelen Leitbündel gebunden, da das ^{32}P im Phloem wandert.

4. Es wäre denkbar, daß der Akkumulationsprozeß einen Konzentrationsgradienten radioaktiver Phosphate im Phloem aufrechterhält und mit diesem Diffusionspotential die treibende Kraft eines gerichteten ^{32}P -Transports schafft. Mehrere Befunde deuten jedoch darauf hin, daß die Akkumulierung von ^{32}P nicht die Voraussetzung der Transportstimulierung ist, daß vielmehr das Kinetinzentrum eine beschleunigte Massenströmung auf sich lenkt, in der die radioaktiven Phosphate mitgezogen werden:
- a) ^{22}Na -Ionen werden von dem Kinetinort attrahiert, ohne wie das ^{32}P -Phosphat dort angereichert zu werden. (Auch die Verteilungskurven von ^{86}Rb , ^{131}I und ^{36}Cl zeigen keine Andeutung eines "Gipfels").
 - b) Einander gegenüberstehende Zentren konkurrieren um das Transportsystem. Mobilisation kann also nicht gleichzeitig in entgegengesetzter Richtung verlaufen; Ausmaß und Richtung der Stoffbewegung hängt vom Verhältnis der mobilisierenden Kräfte ab. So erklärt sich auch die "Polarität" des kinetin-induzierten Transports, der sehr leicht auf die Blattbasis zu, zur Spitze hin aber nur schwer dirigiert werden kann, als eine gegenseitige Hemmung des künstlichen und natürlichen Attraktionszentrums.
 - c) Bei der Auswertung von Verteilungskurven der Isotopen nach einem Transportmodell stimmen beobachtete und für die Annahme einer Massenströmung vorausgesagte Änderungen überein.
5. Der Pumpmechanismus, der die Massenströmung unterhält, ist wahrscheinlich kein Druckstromsystem, sondern ein einfacher Sog.
6. Die Zeitkurve des ^{32}P -Transports ähnelt der Sigmoidkurve einer autokatalytischen Reaktion. Verantwortlich für diese Kinetik ist vor allem die Aktivität des mobilisierenden Zentrums. So überträgt sich der zweiphasige Verlauf der Kinetinreaktion auf die Zeitkurve des Gesamttransports. Die Tatsache, daß kinetininduzierte Chlorophyllinseln sich besser entwickeln und mehr ^{32}P attrahieren, wenn ihnen mehr mobilisiertes Material zur Verfügung steht, ist ein Anzeichen dafür, daß der Sigmoidkurve der Mobilisation wirklich eine selbststimulierende Funktion

des mobilisierenden Zentrums zugrundeliegt. Da kleine physiologische Unterschiede im Gewebe sich bei einem solchen autokatalytischen Prozeß selbst vergrößern, sondern sich in alternden Pflanzen meistens grüne mobilisierende Bezirke von vergilbenden Lieferbereichen ab.

7. Charakteristisch für die Vorgänge am Kinetinort ist die Akkumulation von radioaktivem Phosphat. Das ^{32}P wird selektiv-metabolisch aus dem Phloem in das angrenzende Gewebe aufgenommen und im Stoffwechsel über die Phosphatfraktionen verteilt. Da die spezifische Aktivität des säurelabilen Phosphats der Nucleotide am höchsten ist, stellt das energiereiche Phosphat der Nucleotide wohl das erste Produkt der akkumulierenden Reaktion dar. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine durch Kinetin geförderte Phosphorylierung, die transportiertes anorganisches ^{32}P durch Kopplung an Nucleotide in die Parenchymzellen überführt. Ein Parallelfall ist die Aufnahme von ^{32}P -Orthophosphat in Blattscheiben, die metabolisch (durch Phosphorylierung) gesteuert und durch Kinetin erhöht wird.
8. Gewöhnlich findet unter der Einwirkung des Kinetins eine Abnahme des anorganischen Phosphatgehalts der Blätter und eine Zunahme der Zuckerphosphate statt. Doch bleibt das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten des inkorporierten ^{32}P dabei fast unverändert. Kinetin induziert also nicht eine einseitige Förderung der Phosphorylierungen, sondern steigert den Umsatz der löslichen Phosphate im allgemeinen.
9. Lipide, DNS und Phosphoprotein werden durch Kinetinbehandlung kaum beeinflusst. Ein spezifischer Effekt findet sich dagegen in der RNS-Fraktion: Der RNS-Spiegel wird in Blattscheiben leicht, bei Zufuhr von Material durch Mobilisierung kleinmolekularer Phosphate jedoch sehr stark gehoben. Auch der vermehrte Einbau von transportiertem ^{32}P deutet auf eine Stimulierung der RNS-Synthese hin. Die freien Mononucleotide zeigen keine Zunahme der spezifischen Aktivität, die einen RNS-Syntheseeffekt vortäuschen könnte. Im Gegenteil: ihre spezifische Aktivität ist in kinetininbehandeltem Gewebe niedriger, vermutlich wegen schnelleren Ausgleichs mit dem des Orthophosphats durch Phosphorylierung. Die RNS-Synthese ist also echt. Sie ist auch nicht die Folge eines Überangebots von Vorläufersubstanzen, denn der Phosphatspiegel der Nucleotidfraktion ist in kinetininbehandelten Blatteilen gesenkt, wahrscheinlich als eine Folge des Verbrauchs.
10. Für das Problem der primären Wirkung des Kinetins scheint es von Bedeu-

tung zu sein, daß Kinetinstellen an intakten Pflanzen weder das transportierte ^{32}P akkumulieren noch Chlorophyllinseln hervorrufen. Da das Kinetin auch in alternden isolierten Blättern eine vorhandene Aktivität eher zu konservieren als direkt zu stimulieren scheint (z.B. die Phosphataufnahme), kann man vermuten, daß es in eine Reaktion des Stoffwechsels eingreift, die sich erst während des Verfalls entwickelt.

11. Ribonuclease würde in dieses Schema passen: Die Aktivität nimmt gerade während des Alterns zu und wird durch Kinetinbehandlung der Blätter teilweise unterdrückt; doch hemmt die für die Chlorophyllerhaltung optimale Konzentration des Kinetins (0,1 mg/l) die RNase-Aktivität in Homogenaten nur um ca. 10% (gemessen an Hefe-RNS und endogener RNS).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ARISZ, W.H., 1960: Symplasmatischer Salztransport in Vallisneria-Blättern. Protoplasma 42, 309-343.
- ARNSTEIN, H.R.V., 1961: Action of ribonuclease on the microsomal particles of reticulocytes. Biochem. J. 81, 24p-25p.
- ARONOFF, S., 1955: Translocation from soybean leaves II. Plant Physiol. 30, 184-185.
- BARKER, G.R. und T. DOUGLAS, 1960: Function of ribonuclease in germinating peas. Nature 188, 943-944.
- BAUER, L., 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta 42, 367-451.
- BENSON, A.A., 1955: Phosphorylated sugars. In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, ed. K. Paech und M. V. Tracey, Bd. II, 113-144.
- BIDDULPH, O. und J. MARKLE, 1944: Translocation of phosphorus-32 in the phloem of the cotton plant. Amer. Jour. Bot. 31, 65-70.
- BIDDULPH, O. und R. CORY, 1957: An analysis of translocation in the phloem of the bean plant using THO, P^{32} and $C^{14}O_2$. Plant Physiol. 32, 608-619.
- BIDDULPH, O. und R. CORY, 1960: Demonstration of two translocation mechanisms in studies of bidirectional movement. Plant Physiol. 35, 689-695.
- BIDDULPH, S.F., 1956: Visual indications of S^{35} and P^{32} translocation in the phloem. Amer. Jour. Bot. 43, 143-148.
- BIELESKI, R. L. und G. G. LATIES, 1963: Turnover rates of phosphate esters in fresh and aged slices of potato tuber tissue. Plant Physiol. 38, 586-594.
- BJORKSTEN, J., 1962: Aging: present status of our chemical knowledge. J. Am. Geriatr. Soc. 10, 125-139.
- BÖTTGER, I., 1958: Stoffwechsel der Nucleinsäuren. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie VIII, 814-843. Springer-Verlag, Berlin.

- BORST PAUWELS, G.W.F.H. , 1962: The uptake of radioactive phosphate by yeast I. The uptake of phosphate by yeast compared with that of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 65, 403-406.
- BORST PAUWELS, G.W.F.H. , H.W. LOEF und E. HAVINGA, 1962: The uptake of radioactive phosphate by Yeast II. The primary phosphorylation products. *Biochim. Biophys. Acta* 65, 407-411.
- BRACHET, J. , 1954: Effects of ribonuclease on the metabolism of living root tip cells. *Nature* 174, 876-877.
- CANNY, M.J. , 1961: Measurement of the velocity of translocation. *Ann. Bot. N.S.* 25, 152-167.
- CHEN, S.L. , 1951: Simultaneous movement of phosphorus-32 and carbon-14 in opposite directions in phloem tissue. *Amer. Jour. Bot.* 38, 203-211.
- CHERRY, J. H. , R. H. HAGEMAN und J. B. HANSON, 1962: Effect of x-irradiation on nucleic acids in *Zea mays*. II: On the level of ribonuclease activity in growing seedlings. *Rad. Res.* 17, 740-751.
- CHIBNALL, A.C. , 1954: Protein metabolism in rooted runnerbean leaves. *New Phytol.* 53, 31-37.
- CHVOJKA, L. , K. VERES und J. KOZEL, 1961: The effect of kinins on the growth of apple tree buds and on incorporation of P-32. *Biol. Plant.* 3, 140-147.
- CRANE, R. K. und F. LIPMANN, 1953: The effect of arsenate on aerobic phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 201, 235-243.
- CURTIS, O. F. , 1935: The translocation of solutes in plants. McGraw-Hill, New York, 273 S.
- DAOUST, R. und AMANO, A. , 1963: Ribonuclease and deoxyribonuclease activities in experimental and human tumors by the histochemical substrate film method. *Cancer Res.* 23, 131-134.

- ENGELBRECHT, L., 1961: Beiträge zum Problem der Akkumulation von Aminosäuren in Blattzellen. *Flora* 150, 73-86.
- ESAU, K., 1961: *Plants, viruses and insects*. Harvard University Press, Cambridge/Mass., U.S.A.
- ESTERAK, K.B., 1935: Resistenz-Gradienten in Elodea- Blättern. *Protoplasma* 23, 367-383.
- EVANS, N.T.S., M. EBERT und A model for the translocation of photosynthate in the soybean. *J. Exp. Bot.* 14, 221-231.
- J. MOORBY, 1963:
- FERNALD, E.I., 1925: The inhibition of bud development as correlated with the osmotic concentration of sap. *Amer. Jour. Bot.* 12, 287-305.
- FISCHER, H., 1958a: Der Transport der Kohlenhydrate. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie* VI, 924-934.
- FISCHER, H., 1958b: Transport von organisch gebundenem Stickstoff. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. VIII, 610-636. Springer-Verlag, Berlin.
- FRITZ, H.G. und B. BÖTTGER, Ermittlung von Ribonucleinsäure im Pflanzenmaterial. *Z. Naturforschg.* 18b, 124-132.
- 1963:
- GUNNING, B.E.S. und W.K. Kinin-induced directed transport and senescence in detached oat leaves. *Nature (Lond.)* 199, 262-265.
- BARKLEY, 1963:
- GUTTMAN, R., 1957: Alteration in nuclear ribonucleic acid metabolism induced by Kinetin. *J. Biophys. Biochem. Cytology* 3, 129-131.
- HAGEN, C.E., J.E. LEGGETT The sites of orthophosphate uptake by barley roots. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, 43, 496-506.
- und P.C. JACKSON, 1957:
- HANSON, J.B., 1959: The effect of ribonuclease on oxidative phosphorylation by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 234, 1303-1306.
- HANSON, J.B., 1960: Impairment of respiration, ion accumulation and ion retention in root tissue treated with ribonuclease and ethylenediamine tetraacetic acid. *Plant Physiol.* 35, 372-379.

- HANSON, J.B., C.M. WILSON und C.D. STONER, 1963: Ribonuclease as a factor in declining respiration of aging corn scutellum. *Plant Physiol.* 38, suppl. 42.
- HEITEFUSS, R. und W.H. FUCHS, 1961: Untersuchungen zum Phosphatstoffwechsel von Weizenkeimpflanzen nach Infektion mit *Puccinia graminis tritici*. *Naturwiss.* 14, 505-506.
- HERTEL, R., 1962: Der Auxintransport in der Koleoptile von *Zea mays* L. Dissertation München.
- HEYTLER, P.G. und W.W. PRICHARD, 1962: A new class of uncoupling agents - carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 7, 272-275.
- HONERT, J.H. van den, 1932: On the mechanism of transport of organic materials in plants. *Proc. Koninkl. Akad. Wetensch. Amsterdam* 35, 1104-1111.
- HORWITZ, L., 1958: Some simplified mathematical treatments of translocation in plants. *Plant Physiol.* 33, 81-93.
- JACKSON, P.C., S.B. HENDRICKS und B.M. VASTA, 1962: Phosphorylation by barley root mitochondria and phosphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.* 37, 8-17.
- JENSEN, W.A. und E.G. POLLOCK, 1958: Effect of Kinetin on the protein and nucleic acid content of root tip cells. *Plant Physiol.* 33, suppl. XV.
- JONES, H. und J.E. EAGLES, 1962: Translocation of ¹⁴ carbon within and between leaves. *Ann. Bot., N.S.*, 26, 505-509.
- KENNEDY, J.S. und T.E. MITTLER, 1953: A method of obtaining phloem sap via the mouth parts of aphids. *Nature (Lond.)* 171, 528.
- KESSLER, B. und N. ENGELBERG, 1962: Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 70-82.
- KÜSTER, E., 1921: Botanische Betrachtungen über Alter und Tod. *Abhandlg. z. theoret. Biologie Heft* 10.

- KULAYEVA, O.N., 1962: The effect of roots on leaf metabolism in relation to the action of Kinetin on leaves. *Fiziol. Rastenii Transl.* 9, 182-189.
- KULAYEVA, O.N. und I.B. VOROBYEVA, 1962: The mode of action of Kinetin on protein synthesis. *Fiziol.Rast. transl.* 9, 77-79.
- KURAIISHI, S., 1959: Effect of Kinetin analogs on leaf growth. *Sci.Pap. Coll.Gen. Education Tokyo* 9, 67-104.
- KURAIISHI, S. und F.S. OKUMURA, 1956: The effect of Kinetin on leaf growth. *Bot.Mag. (Tokyo)* 69, 300-306.
- KURSANOW, A.L. und E.I. VYSKRIBENTSEVA, 1960: Primary inclusion of phosphates in root metabolism. *Fiziol. Rast. (Transl.)* 7, 230-236.
- LATIES, G.G., 1959: Active transport of salt into plant tissue. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 10, 87-112.
- LEGGETT, C.E., 1961: Entry of phosphate into yeast cells. *Plant Physiol.* 36, 277-284.
- LELOIR, L.F. und C.E. CARDINI, 1957: Characterization of phosphorus compounds by acid lability. In: *Methods in Enzymology III*, 840-850. ed. S.P. Colowick und N.O. Kaplan.
- LEOPOLD, A.C., 1961: Senescence in plant development. *Science* 134, 1727-1732.
- LEOPOLD, A.C. und M. KAWASE, 1964: Benzyladenine effects on bean leaf growth and senescence. *Amer. Jour. Bot.* 51, 294-298.
- LINDEMUTH, H., 1904: Über das Größerwerden isolierter ausgewachsener Blätter nach ihrer Bewurzelung. *Ber.dt.bot.Ges.* 22, 171-174.
- LUNDEGARDH, H., 1960: *Pflanzenphysiologie*. Jena, 717 S.
- MACIEJEWSKA-POTAPCZYK, M., 1959: Influence of Kinetin, indoleacetic acid and gibberellic acid on nuclease activity of bean *Phaseolus vulgaris* hypocotyls. *Nature (Lond.)* 184, 557-558.
- MARKHAM, R., 1955: Nucleic acids, their components and related compounds. In: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse IV*, 246-304. ed. K.Paech und M.V. Tracey.

- MARRE, E., 1961: Phosphorylation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12, 195-218.
- MARTIN, J.B. und DOTY, D.M., 1949: Determination of inorganic phosphate. A modification of the isobutyl alcohol procedure. *Anal. Chem.* 21, 965-967.
- MASKELL, E.J. und T.G. MASON, 1929: Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant. II. Observations on concentration gradients. *Ann. Bot.* 43, 616-652.
- MASON, T.G. und E.J. MASKELL, 1928: Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant. II. The factors determining the rate and the direction of movement of sugars. *Ann. Bot.* 42, 571-636.
- MASON, T.G. und E. PHILLIS, 1937: The migration of solutes. *Bot. Rev.* 3, 47-71.
- McCALLA, D.M., D.J. MORRE und D.J. OSBORNE, 1962: Metabolism of a kinin, benzyladenine. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 522-528.
- McKEE, H.S., 1958: Nitrogen metabolism in leaves, In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie VIII*, 516-553. Springer Verlag, Berlin.
- MICHAEL, G., 1935: Über die Beziehungen zwischen Chlorophyll- und Eiweißabbau in vergilbenden Laubblättern. *Zeitschr. Bot.* 29, 385-425.
- MILLER, C.O., 1961: Kinetin and related compounds in plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12, 395-408.
- MOEWUS, F., 1959: Competitive antagonism between Kinetin and 8-azaguanine in *Polytoma uvella*. *Science* 130, 921-922.
- MOLISCH, H. 1929: Die Lebensdauer der Pflanzen. Gustav Fischer, Jena.
- MOTHES, K., 1960: Über das Altern von Blättern und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. *Naturwiss.* 47, 337-351.

- MOTHES, K., 1961: Der Beitrag der Kinetinforschung zum Verständnis pflanzlicher Korrelationen. Ber. dt. bot. Ges. 74, (24)-(42).
- MOTHES, K., und W. BAU- Untersuchungen über die Reversibilität der Aus-
DISCH, 1958: bleichung grüner Blätter.
Flora 146, 521-531.
- MOTHES, K., L. ENGEL- Über die Wirkung des Kinetins auf Stickstoffver-
BRECHT und O. KULAYEVA, teilung und Eiweißsynthese in isolierten Blättern.
1959: Flora 147, 445-464.
- MOTHES, K. und L. ENGEL- Kinetin-induced directed transport of substances
BRECHT, 1961: in excised leaves in the dark. Phytochem. 1,
58-62.
- MOTHES, K., L. ENGEL- Über die Akkumulation von γ -Aminoisobuttersäure:
BRECHT und H.R. SCHÜTTE, im Blattgewebe unter dem Einfluß von Kinetin.
1961: Physiol. Plantarum 14, 72-75.
- MÜNCH, E., 1927: Versuche über den Saftkreislauf. Ber. dt. bot. Ges.
45, 340-356.
- OLSZEWSKA, M.J., 1959: Autoradiographic study of the effect of Kinetin on
Adenine incorporation into the cells of the radicular meristem of *Allium cepa*.
Exptl. Cell Res. 16, 193-201.
- ORITANI, Z., 1962: Studies on the physiological function of the crop
roots II. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 30, 279.
- OSBORNE, D.J., 1962: Effect of Kinetin on protein and nucleic acid
metabolism in *Xanthium* leaves during senescence.
Plant Physiol. 37, 595-602.
- OSBORNE, D.J. und Rapid Bioassay for Kinetin and Kinins using se-
McCALLA, D.R., 1961: nescing leaf tissue.
Plant Physiol. 36, 219-221.
- PAECH, K. und F. EBER- Altern und Zelltod. In: Handbuch d. Pflanzenphy-
HARDT, 1956: siologie II, 908-936.
Springer-Verlag, Berlin.
- PARTHIER, B., 1961: Über den Einfluß des Kinetins auf die Aminosäure-
Inkorporation in Blattscheiben von Tabak.
Flora 151, 518-534.

- PARTHIER, B. und R. WOLL-GIEHN, 1961: Über den Einfluß des Kinetins auf den Eiweiß- und Nucleinsäurestoffwechsel in isolierten Tabakblättern. *Ber. dt. bot. Ges.* 74, (47)-(51).
- PEEL, A. und P.E. WEATHERLEY, 1963: Studies in sieve-tube exudation through aphid mouthparts. II: The effects of pressure gradients in the wood and metabolic inhibitors. *Ann. Bot.* 27, 197-211.
- PENOT, M., 1963: Mouvements liberiens du phosphore liés à l'apport de cinétine. *Comptes rendus* 256, 488-460.
- PFEFFER, W., 1897: Pflanzenphysiologie. I: Stoffwechsel. 2. Aufl., Leipzig.
- PHILLIS, E. und T.G. MASON, 1933: Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant. III: The polar distribution of sugar in the foliage leaf. *Ann. Bot.* 47, 585-634.
- PRINGSHEIM, E., 1906: Wasserbewegung und Turgorreaktion in der welkenden Pflanze. *Jb. wiss. Bot.* 43, 89-144.
- RICHMOND, A.E. und A. LANG, 1957: Effect of Kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. *Science* 125; 650-651.
- RICHTER, O., 1915: Über das Erhaltenbleiben des Chlorophylls in herbstlich verfärbten und abgefallenen Blättern durch Tiere. *Z. f. Pflanzenkrankheiten* 25, 385-392.
- ROBERTSON, R.N., M.J. WILKINS und D.C. WEEKS, 1951: Studies in the metabolism of plant cells. IX: The effects of 2,4-dinitrophenol on salt accumulation and salt respiration. *Austral. J. Sci. Res.* 134, 248-264.
- SACHS, J., 1887: Vorlesungen über Pflanzenphysiologie. 2. Aufl., Leipzig.
- SCHMIDT, G., 1957: Determination of nucleic acids by phosphorus analysis. In: *Methods in Enzymology* III, 671-679. Ed. S.P. Colowick und N.O. Kaplan.

- SCHMIDT, G. und S.J. THANN-HAUSER, 1945: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 161, 83-89.
- SCHUMACHER, W., 1930: Untersuchungen über die Lokalisation der Stoffwanderung in den Leitbündeln höherer Pflanzen. *Jb. wiss. Bot.* 73, 770-823.
- SCHUMACHER, W., 1947: Zur Frage nach den Stoffbewegungen im Pflanzenkörper. *Naturwiss.* 34, 176-179.
- SHANNON, J.C. und J.L. KEY, 1963: Effects of auxin and Kinetin on RNA-metabolism in excised soybean hypocotyl tissue. *Plant Physiol.* 38, suppl. XLV.
- SPANNER, D.C. und J.N. PREBBLE, 1962: The movement of tracers along the petiole of *Nymphoids peltatum*. I: A preliminary study with Cs-137. *J. Exptl. Bot.* 13, 294-306.
- STAHL, E., 1909: Zur Biologie des Chlorophylls, Laubfarbe und Himmelslicht, Vergilbung und Etiolment. Gustav Fischer, Jena.
- SUGIURA, M., 1963: Effect of red and far red light on protein and phosphate metabolism in tobacco leaf discs. *Bot. Mag. (Tokyo)* 76, 174-180.
- SUGIURA, M., K. UMEMURA und Y. OOTA, 1962: The effect of Kinetin on protein level of tobacco leaf discs. *Physiol. Plantarum* 15, 457-464.
- SUTCLIFFE, J.E. und D.P. HACKETT, 1957: Efficiency of ion transport in biological systems. *Nature (Lond.)* 180, 95-96.
- SWANSON, C.A., 1959: Translocation of organic solutes. In: *Plant Physiology*, ed. F.C. Steward, II, 481. Academic Press, N.Y.
- SWANSON, C.A. und J.B. WHITNEY, 1953: Studies on the translocation of foliar-applied phosphorus-32 and other radioisotopes in bean plants. *Amer. Jour. Bot.* 40, 816-823.
- SWART, N., 1914: Die Stoffwanderung in ablebenden Blättern. Gustav Fischer, Jena.

- THIMANN, K. V. und M. M. LALORAYA, 1960: Changes in nitrogen in pea stem sections under the action of Kinetin. *Physiol. Plantarum* 13, 165-178.
- TIEGHEM, P. van, 1873: Recherches physiologiques sur la germination. *Ann. sci. nat. V. sér. botanique* 17, 205-225.
- TOLBERT, N. E. und H. WIEBE, 1955: Phosphorus and sulfur compounds in plant xylem sap. *Plant Physiol.* 30, 499-504.
- VARNER, J. E., 1961: Biochemistry of senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12, 245-264.
- VERNON, L. P. und S. ARONOFF, 1952: Metabolism of soybean leaves. IV: Translocation from soybean leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 36, 383-398.
- VRIES, H. de, 1885: Über die Bedeutung der Circulation und der Rotation des Protoplasmas für den Stofftransport in der Pflanze. *Bot. Zeitschr.* 43, 2-6 und 18-26.
- WILLIAMS, R. F., 1955: Redistribution of mineral elements during development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6, 25-42.
- WILSON, C. M., 1963: Chromatographic separation of ribonucleases in corn. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 177-184.
- WILSON, C. M. und J. C. SHANNON, 1963: The distribution of ribonucleases in corn, cucumber and soybean seedlings. Effects of isolation media. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 311-313.
- WITTEWER, S. H. und E. G. TEUBNER, 1959: Foliar absorption of mineral nutrients. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 10, 13-32.
- WOLLGIEHN, R., 1961a: Untersuchungen über den Einfluß des Kinetins auf den Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel isolierter Blätter. *Flora* 151, 411-437.
- WOLLGIEHN, R., 1961b: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel in grünen Blättern. *Flora* 150, 117-127.

- YEMM, E.W. , 1956: The metabolism of senescent leaves. In: Aging in transient tissues; CIBA-Foundation-Colloquium II, 202-214.
- ZIEGLER, H. , 1956: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. *Planta* 47, 447-500.
- ZIEGLER, H. und G.H. VIEWEG, 1961: Der experimentelle Nachweis einer Massenströmung im Phloem von *Heracleum mantegazzianum* Somm. et Lev. *Planta* 56, 402-408.
- ZIEGLER, H. und KLUGE, M. , 1962: Die Nucleinsäuren und ihre Bausteine im Siebröhrensaft von *Robinia pseudacacia* L. *Planta* 58, 144-153.
- ZIMMERMANN, M.H. , 1961: Movement of organic substances in trees. *Science* 133, 73-79.

Die vorliegende Arbeit wurde mit der finanziellen Unterstützung eines "Research Grant " durchgeführt, das Prof. Dr. A. C. Leopold von der U. S. National Science Foundation erhielt (G-21918). Herrn Professor Dr. A. C. Leopold möchte ich herzlich dafür danken, daß er mir das Thema überließ und die Möglichkeit gab, in seinem Labor zu arbeiten. Besonders bin ich ihm aber für seine ständige Anteilnahme am Fortgang der Arbeit, für seine geduldige wie großzügige Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Auch Herrn Professor Dr. L. Brauner und Herrn Dr. M. Zenk möchte ich hier meinen herzlichen Dank für die freundliche Beratung und Hilfe aussprechen, insbesondere für die Vermittlung der Arbeitsmöglichkeit in den U. S. A. Für wertvolle Kritik und Anregungen bin ich weiterhin auch Herrn Dr. R. Hertel, Herrn Dr. S. L. Lam und Herrn Widmar Tanner sehr verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 30. Oktober 1934 wurde ich, Karl Müller, als Sohn des Malermeisters Hans Müller und seiner Ehefrau Katharina Müller, geb. Schmidt, in Schauenstein (Ofr.) geboren. Von 1941 bis 1947 besuchte ich die Volksschule in Schauenstein, von 1947 bis 1950 das humanistische Gymnasium in Bayreuth und von 1950 bis 1956 das Jean-Paul-Gymnasium in Hof/Saale. Nachdem ich dort 1956 die Reifeprüfung abgelegt hatte, studierte ich von 1956 bis 1959 Botanik und Chemie an der Universität München, von 1959 bis 1960 dieselben Fächer an der Universität Tübingen. Im Sommer 1960 erhielt ich durch Vermittlung von Herrn Professor Dr. L. Brauner und Herrn Dr. M. Zenk ein "Research Assistantship" an der Purdue University, Lafayette, Indiana, USA, bei Herrn Professor Dr. A.C. Leopold. Unter seiner Anleitung arbeitete ich an meiner Dissertation. Außerdem besuchte ich dort Vorlesungen und Kurse in Pflanzenphysiologie und Biophysik. Nach meiner Rückkehr nach Deutschland im Herbst 1963 schrieb ich mich für ein weiteres Semester an der Universität Tübingen ein, um vor allem mikrobiologische Vorlesungen zu hören.

